

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Química e Bioquímica



Proteómica da Paramiloidose

Ana Catarina Leite Guerreiro

Mestrado em Bioquímica
(Especialização em Bioquímica Médica)

2010

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Química e Bioquímica



Proteómica da Paramiloidose

Ana Catarina Leite Guerreiro

Dissertação orientada pelo Doutor Carlos Cordeiro e pelo Doutor
Gonçalo da Costa

Mestrado em Bioquímica
(Especialização em Bioquímica Médica)

2010

Agradecimentos

Gostaria de agradecer em primeiro lugar ao Doutor Gonçalo da Costa pela forma como me orientou, mostrando a sua confiança em mim e ajudando e apoiando em todos os aspectos da realização deste trabalho e do futuro.

Agradeço também ao Doutor Carlos Cordeiro, também meu orientador, pelas suas sugestões, disponibilidade e simpatia.

Agradeço à Professora Doutora Ana Ponces, por me receber no seu grupo e laboratório de enzimologia, e também pela sua disponibilidade e simpatia.

Agradeço aos meus colegas do laboratório de enzimologia pelas suas sugestões, nesta fase de aprendizagem, em especial à Doutora Marta Silva, ao Doutor António Ferreira, Doutor Francisco Pinto, pela sua contribuição “especial” e essencial neste trabalho.

Gostaria de salientar e agradecer o auxílio do Doutor Ricardo do Instituto de Tecnologia Química e Bioquímica nas análises de espectrometria de massa, pois sem ele não conseguiria obter tantos resultados cruciais.

Queria também agradecer ao laboratório onde realizei as digitalizações dos géis, por permitirem a obtenção de imagens valiosas.

Numa nota mais pessoal quero agradecer à minha Mãe e ao meu Pai pela força que me deram até ao final e por acreditarem em mim e me proporcionarem um futuro que se transformou em presente. “Graças a vocês estou feliz e sinto que consigo ‘crescer’”.

À minha Irmã pela paciência e pelos momentos de diversão.

À minha Tia São pelos seus conselhos “académicos”.

Por fim agradeço ao Miguel pela presença em todos os momentos menos bons e por me lembrar sempre que há vida depois e para além da tese. “Obrigada por me fazeres feliz”

Muito obrigada a todos.

Lista de artigos

da Costa, G., Gomes, R., Guerreiro, A., & Mateus, E. (2010). Looking beyond genetic factors in familial amyloidotic polyneuropathy: protein glycation and chaperone activity loss. *PNAS*, 4, 674-678.

da Costa, G., Guerreiro, A., Correia, C., Gomes, R., Freire, A., Monteiro, E., et al. (2010). A non-invasive method based on saliva to characterize TTR in FAP patients using FT-ICR high-resolution mass spectrometry. *PROTEOMICS - Clinical Applications*, submitted.

Índice

Agradecimentos	iii
Lista de artigos	v
Índice	vii
Abreviaturas	xi
Lista de Figuras	xv
Lista de Tabelas	xvii
Resumo	xix
Abstract	xxi

I. Introdução.....	1
1. Polineuropatia Amiloidótica Familiar (PAF)	3
1.1 Contexto histórico	3
1.2 Sintomatologia.....	4
2. A PAF e a transtirretina (TTR)	6
2.1 Gene da TTR.....	6
2.2 Expressão da TTR	7
2.3 A proteína e a sua função biológica	7
2.4 Mutações no gene da TTR	8
2.5 Processo de amiloidogénese de TTR	10
2.6 Toxicidade induzida pelos depósitos amilóides de TTR.....	12
3. PAF e glândulas salivares.....	14
3.1 Depósitos de TTR nas glândulas salivares	14
3.2 Saliva total	14
3.2.1 Definição	14
3.2.2 Saliva como fluido de diagnóstico	16
3.2.1.1 Vantagens e desvantagens da utilização da saliva versus outros fluidos muito utilizados: soro ou plasma	17
4. Detecção e diagnóstico: importância dos biomarcadores	18
5. Tratamentos: passado, presente e futuro.....	20
II. Métodos e Materiais	25
1. Recolha e armazenamento da saliva total	27
2. Quantificação de proteína total na saliva total.....	27
3. Electroforese unidimensional (1D) – SDS-PAGE.....	27
3.1 Géis de poliacrilamida.....	29
3.2 Preparação e aplicação da amostra.....	29
3.3 Corrida electroforética.....	29
3.4 Coloração dos géis	29
3.5 Análise por <i>Phoretix</i>	30
4. Electroforese bidimensional (2D)	30
4.1 Primeira dimensão – Focagem isoeléctrica	30
4.1.1 Preparação e aplicação da amostra.....	30
4.2 Segunda dimensão – SDS-PAGE.....	31

4.2.1	Preparação das tiras	31
4.2.2	Corrida electroforética	32
4.3	Análise por <i>Samespots</i>	32
5.	<i>Western-blotting</i>	32
5.1	Transferência	33
5.2	Bloqueio da membrana	34
5.3	Incubação da membrana com os anticorpos.....	34
5.3.1	Anticorpo primário	34
5.3.2	Anticorpo secundário	34
5.4	Revelação.....	34
6.	Espectrometria de massa	35
6.1	Digestão <i>in gel</i> das proteínas.....	36
6.1.1	Excisão	37
6.1.2	Lavagem.....	37
6.1.3	Redução e alquilação.....	37
6.1.4	Digestão com tripsina.....	37
6.2	Purificação e aplicação na placa dos péptidos digeridos.....	38
6.2.1	Preparação da coluna	38
6.2.2	Purificação e concentração dos péptidos.....	38
6.3	Obtenção dos espectros e das massas	38
6.4	Identificação das proteínas por PMF	38
III.	Resultados.....	39
1.	Quantificação de proteína total	41
2.	Perfis electroforéticos de saliva total de indivíduos com PAF e indivíduos controlo	42
3.	Identificação das proteínas presentes na saliva total de indivíduos PAF e de indivíduos controlo separadas por SDS-PAGE.....	43
4.	Identificação de proteínas diferenciadamente expressas em indivíduos PAF e indivíduos controlo	46
4.1	Análise por <i>Samespots</i> e pesquisa de proteínas com expressão diferencial	46
4.2	Identificação das proteínas diferenciadamente expressas	49
5.	Pesquisa de proteínas glicadas na saliva total de indivíduos PAF e de indivíduos controlo	52
5.1	SDS-PAGE	52
5.2	Electroforese bidimensional	53
6.	Identificação das proteínas glicadas na saliva total de indivíduos PAF e de indivíduos controlo	54
6.1	SDS-PAGE	54
6.2	Electroforese bidimensional	55
7.	Variação da glicação de proteínas da saliva total em indivíduos PAF transplantados com fígado <i>wild type (wt)</i> e em indivíduos com doenças hepáticas terminais transplantados com fígado PAF	57
8.	Variação da composição de TTR monomérica e tetramérica	58

IV. Discussão.....	61
1. Perspectivas Futuras	63
V. Referências.....	65
VI. Anexos	82
1. Soluções	84
1.1 Electroforese unidimensional	84
1.2 Electroforese bidimensional	85
1.3 Coloração e descoloração	86
1.4 <i>Western-blotting</i>	86
1.5 Digestão proteica <i>in gel</i>	86
2. Quantificação de proteína total nas amostras de saliva	88
3. Proteínas identificadas por PMF a partir de géis 1D com saliva total de indivíduos controlo (C) e com PAF (P)	89
4. Análise dos géis bidimensionais efectuada pelo programa <i>Samespots</i>	95
5. Proteínas expressas diferenciadamente identificadas por PMF a partir de géis 2D com saliva total de indivíduos controlo e com PAF	104
6. Artigos publicados.....	106

Abreviaturas

1D	Electroforese unidimensional
2D	Electroforese bidimensional
8-OHdG	8-hidroxi-2'-desoxiguanosina
A25T/Ala25Thr	Substituição do resíduo de alanina por um de treonina
ACN	Acetonitrilo
AGE	Produtos avançados de glicação (<i>advanced glycation end-products</i>)
Bax	Proteína X associada ao Bcl-2 (<i>Bcl-2-associated X protein</i>)
<i>BR</i>	<i>BioRad</i>
BSA	Albumina sérica bovina (<i>bovine serum albumin</i>)
<i>C</i>	<i>Chemetron</i>
CHCA	Ácido α -ciano-4-hidroxicinamico
CNBr	Brometo de cianogénio
D18G/Asp18Gly	Substituição do resíduo de aspartato por um de glicina
DRG	Gânglio espinal (<i>dorsal root ganglia</i>)
DTT	Ditiotreitol
ELISA	<i>Enzyme linked immuno sorbent assay</i>
EMG	Electromiografia
ESI	<i>Electrospray ionization</i>
<i>F</i>	<i>Fisher</i>
FT-ICR	<i>Fourier transform-ion cyclotron resonance</i>
<i>GE</i>	<i>GE-Healthcare</i>
Grx1	Glutaredoxina
HNE	Hidroxinonenal
HNF	Factor nuclear do hepatócito (<i>hepatocyte nuclear factor</i>)
IEF	Focagem isoelétrica (<i>isoelectric focusing</i>)
Ig	Imunoglobulina

IL	Isoleucina
IMC	Índice de massa corporal
IPG	Gradientes imobilizados de pH (<i>immobilized pH gradients</i>)
JUNK	<i>Jun N-terminal kinase</i>
L111M/Leu111Met	Substituição do resíduo de leucina por um de metionina
L58H/Leu58His	Substituição do resíduo de leucina por um de histidina
M	<i>Merck</i>
M&B	<i>M&B</i>
MALDI	<i>Matrix assisted laser desorption ionization</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MS	Espectrometria de massa (<i>mass spectrometry</i>)
NF-kB	Factor nuclear kB (<i>nuclear factor k-B</i>)
NL	Não linear (<i>non linear</i>)
NSAID	Fármacos anti-flamatórios não-esteróides (<i>non-steroidal anti-inflammatory drugs</i>)
PAF	Polineuropatia Amiloidótica Familiar
PCA	Análise dos componentes principais (<i>principal components analysis</i>)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
pI	Ponto isoelectrico
PMF	<i>Peptide mass fingerprinting</i>
POD	Peroxidase
PRP	Proteínas ricas em resíduos de prolina (<i>proline rich proteins</i>)
PVDF	<i>Polyvinylidene difluoride</i>
R104H/Arg104His	Substituição do resíduo de arginina por um de histidina
RAGE	Receptor de produtos avançados de glicação
RBP	Proteína de ligação a retinol (<i>retinol binding protein</i>)
RE	Retículo endoplasmático

RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
S	<i>Sigma</i>
SAP	Componente P (<i>serum amyloid P-component</i>)
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl-sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis</i>
SL	Glândula sublingual
SM	Glândula submandibular
SSCP	<i>Single stranded conformational polymorphisms</i>
T119M/Thr119Met	Substituição do resíduo de leucina por um de histidina na posição 58
T60A/Thr60Ala	Substituição do resíduo de treonina por um de alanina na posição 60
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TFA	Ácido trifluoroacético (<i>trifluoroacetic acid</i>)
TOF	<i>Time of flight</i>
TTR	Transtirretina
V122I/Val122Ile	Substituição do resíduo de valina por um de isoleucina
V30M/Val30Met	Substituição do resíduo de valina por um de metionina na posição 30
Wt	<i>Wild type</i>

Índice de figuras

Figura I-1 – Hipótese neurodegenerativa por <i>dying back</i>	5
Figura I- 2 – Sintomas da PAF	5
Figura I- 3 - Gene da TTR com mutação na posição V30M	6
Figura I- 4 – Dímero de TTR.....	7
Figura I- 5 – Tetrâmero de TTR associado à tiroxina (esquerda) (PDB-1rlb) e a duas moléculas de RBP (direita) (PDB-2rox)	8
Figura I- 6 – Sequência de aminoácidos da TTR humana com algumas das mutações já identificadas (a vermelho)	9
Figura I- 7 – Produtos avançados de glicação (AGE) formados a partir da reacção entre o metilglioxal e os resíduos proteicos de arginina e lisina.....	11
Figura I- 8 – Modelo do mecanismo de formação de fibras amilóides de TTR.....	12
Figura I- 9 – Hipótese para a sinalização molecular envolvida na neurodegeneração na PAF... ..	13
Figura I- 10 – Mecanismo hipotético que demonstra as diferentes formas pelas quais a TTR pode causar a disfunção neuronal	14
Figura I- 11 – Localização das três glândulas salivares principais	15
Figura I- 12 – Mecanismo de transporte de proteínas e iões do soro para os ductos das glândulas salivares	15
Figura I- 13 – Número de proteínas pertencentes à saliva total e saliva das glândulas parótida, sublingual (SL) e submandibular (SM), e do plasma, e suas sobreposições	17
Figura I- 14 – RFLP.PCR do exão 2 do gene da TTR	19
Figura I- 15 - Western Blotting de duas amostras de indivíduos sem PAF (esquerda) e outras duas de indivíduos com PAF (direita).	19
Figura I- 16 – Esquema de transplante sequencial (ou em dominó)	21
Figura I-17 – Estratégias de tratamento da PAF baseadas na hipótese de amiloidogénese de destabilização do tetrâmero.	23
Figura II-18 –Representação esquemática de uma montagem para uma corrida electroforética e do processo de separação das proteínas com o SDS e o β -mercaptoetanol.	28
Figura II-19 – Representação esquemática do processo de preparação da amostra e de re-hidratação da tira de gel no “sarcófago” ou suporte para tiras.	31
Figura II-20 – Esquema de montagem da segunda dimensão da electroforese bidimensional semelhante ao utilizado	32
Figura II -21 – Representação esquemática da fase de detecção do western-blotting	33
Figura II -22 – Esquema da montagem realizada para a transferência no <i>western-blotting</i>	33
Figura II -23 – Esquema da reacção de formação de luz a partir do luminol, com utilização de peroxidase.....	35
Figura II -24 – Representação esquemática dos componentes mais comuns encontrados num espectrómetro de massa.	35
Figura II -25 – Representação esquemática da fonte iónica do tipo MALDI (A) e dois tipos de analisadores de massa	36
Figura II -26 – Esquema do processo de análise proteica pelo método de PMF	36
Figura III-27 – Padrão utilizado no método de Bradford	41
Figura III-28 – Concentração média de proteína total da saliva total de indivíduos controlo e com PAF.....	41

Figura III-29 – Perfil electroforético diferencial da saliva total de indivíduos controlo e com PAF	42
Figura III-30- Perfil electroforético com percentagem de acrilamida menor que 12% da saliva total de indivíduos controlo e com PAF	42
Figura III-31 – Pesquisa de α -sinucleína na saliva total humana	45
Figura III-32 – Análise de componentes principais (<i>principal components analysis</i> – PCA) para os géis 2D de saliva total de três indivíduos controlo e três indivíduos com PAF	46
Figura III-33 – Gel de electroforese bidimensional controlo com <i>spots</i> assinalados depois de análise por <i>Samespots</i>	46
Figura III-34 – Spots controlo e PAF com volumes diferentes	48
Figura III-35 – Número de spots correspondes às identificações de cada uma das proteínas diferenciadamente expressas	51
Figura III-36 – Pesquisa de proteínas glicadas por argpirimidina e tetra-hidropirimidina.....	52
Figura III-37 – Pesquisa de proteínas glicadas por argpirimidina.....	53
Figura III-38 – Bandas seleccionadas para identificação para PMF	54
Figura III-39 – Proteínas glicadas com argp ou THP identificadas na saliva total de indivíduos controlo	55
Figura III-40 – Spots de proteínas glicadas com argp da saliva total de indivíduos controlo e com PAF.....	56
Figura III-41 – Evolução da glicação proteica com argpirimidina em PAF ao longo do tempo ...	57
Figura III-42 – Composição de TTR monomérica na saliva total de indivíduos controlo e com PAF.	58
Figura VI-43 – Análise de spots pelo programa Samespots	95

Índice de tabelas

Tabela I-1 - Proteínas salivares mais abundantes	16
Tabela II-2 – Condições de focagem isoelétrica utilizadas no aparelho da Ettan IPGphorII	31
Tabela II-2 – Anticorpos primários e secundários correspondentes, com a diluição em solução de 1% de leite em pó.....	34
Tabela 0-4 – Proteínas identificadas por PMF a partir de SDS-PAGE de saliva total de indivíduos controlo e com PAF	43
Tabela 0-5 – Proteínas identificadas a partir dos géis 1D acima da sua massa molecular	44
Tabela 0-6 – Proteínas identificadas na saliva total de indivíduos controlo com expressão diferencial.....	49
Tabela 0-7 – Proteínas identificadas na saliva total de indivíduos controlo com expressão diferencial.....	56
Tabela VI-8 – Sample Buffer	84
Tabela VI-9 - Gel de resolução (1 mm) – 12%.	84
Tabela VI-10 - Gel de concentração (1 mm ou 1,5 mm) – 4%.....	84
Tabela VI-11- 1,5 M Tris-HCl, pH=8,8	84
Tabela VI-11- 1,5 M Tris-HCl, pH=8,8	84
Tabela VI-12- 0,5 M Tris-HCl, pH=6,8.	84
Tabela VI-13 - Tampão de corrida desnaturante 5x.....	84
Tabela VI-14 - Solução de equilíbrio SDS.....	85
Tabela VI-15 - Solução de re-hidratação	85
Tabela VI-16 - Gel SDS-PAGE – 12%	85
Tabela VI-17 - Solução de agarose	85
Tabela VI-18 - Azul coomassie.....	86
Tabela VI-19 – Descorante	86
Tabela VI-20 - Plus-One silver staining kit ^{GE}	86
Tabela VI-21 - Tampão de transferência	86
Tabela VI-22 - Ponceau S.....	86
Tabela VI-23 - TBS-Tween 20 (TBS-T), V _t =500 ml	86
Tabela VI-24 - TBS, pH=7,5, V _t = 1L.....	86
Tabela VI-25 - 550 mM DTT.....	86
Tabela VI-26 - 100 mM NH ₄ HCO ₃	86
Tabela VI-27 - 10 mM DTT.....	86
Tabela VI-28 - 110 mM iodoacetamida	87
Tabela VI-29 - 55mM iodoacetamida.....	87
Tabela VI-30 - 0,1 µg/µl tripsina.....	87
Tabela VI-31 - 6,7 ng/ µl tripsina.....	87
Tabela VI-32 – Quantificação de proteína total em amostras de saliva total de indivíduos controlo e com PAF	88
Tabela VI-33 – Proteínas identificadas na saliva total de indivíduos controlo e com PAF.....	89
Tabela VI-34 – Proteínas expressas diferenciadamente em saliva total de indivíduos controlo e com PAF.....	104

Resumo

A Polineuropatia Amiloidótica Familiar (PAF) é uma doença neurodegenerativa, com manifestações clínicas entre a terceira e a quarta década de vida, associada à deposição de agregados amilóides de transtirretina (TTR) em diversos tecidos. A TTR é produzida maioritariamente pelo fígado. A PAF está associada a mutações pontuais na TTR, desestabilizadoras da sua estrutura tetramérica, levando à formação de monómeros sem a sua estrutura nativa.

O diagnóstico da PAF é importante para a aplicação de tratamentos adequados e atempados, e a pesquisa de biomarcadores pré-sintomáticos é vital. A saliva total é um fluído de diagnóstico de confiança e é utilizado para algumas doenças, por ser de recolha e análise fáceis em relação ao sangue, e pelo facto da saliva ter proteínas filtradas a partir do soro. As glândulas salivares em indivíduos com PAF encontram-se infiltradas com depósitos de TTR, pelo que podem ocorrer alterações a nível do proteoma e de modificações pós-traducionais, como a glicação, que podem servir como biomarcadores.

Neste trabalho, verificou-se que os perfis electroforéticos da saliva dos indivíduos com PAF se encontram alterados. Foi possível identificar proteínas que não tinham sido identificadas antes na saliva, como a α -sinucleína, sendo que esta mostra um perfil electroforético, por si só, alterado. Estas eram maioritariamente filtradas a partir do soro. Por outro lado, foi observada uma expressão proteica diferencial na saliva dos indivíduos com PAF, sendo que algumas das proteínas identificadas como diferenciadamente expressas, também se encontravam glicadas. A par destes resultados foi verificada a presença de monómeros de TTR em maior quantidade do que o seu tetrâmero, na saliva dos indivíduos PAF.

Finalmente, foi possível a identificação de proteínas expressas diferenciadamente na saliva de indivíduos PAF, que podem ser utilizadas como biomarcadores para a PAF, podendo ser consideradas como eventuais biomarcadores pré-sintomáticos.

Palavras-chave: PAF, TTR, biomarcadores, saliva, glicação.

Abstract

Familial amyloidotic polyneuropathy is a neurodegenerative disease, with symptomatic manifestations between the third and fourth decade of life, related with amyloid deposition of transthyretin (TTR) in different tissues. TTR is mostly produced in the liver and in FAP is present with point mutations, which can destabilize the tetrameric native structure of this protein and lead to the formation of unfolded monomers.

FAP diagnosis is a very important part of an adequate and prompt treatment, and the search of pre-symptomatic biomarkers is vital. The whole saliva is a reliable diagnostic fluid which is being used in some diseases, because it's easier to obtain and analyze than blood, and it has some proteins in common with serum, which were filtered from it. The salivary glands of FAP individuals contain TTR deposits that can influence the proteome and post-translational modifications, such as glycation, that can be used as biomarkers.

In the present work we were able to observe distinct electrophoretic profiles in the saliva of FAP patients. We also identified new proteins in saliva, such as α -synuclein, which also presented an altered electrophoretic profile. The identified proteins were mostly from serum. On the other hand, it was observed a differential expression of FAP proteins, some of those with glycated residues.

Mean while, it was observed an higher percentage of TTR monomers than tetramers in FAP saliva.

The identification of differentially expressed saliva proteins in FAP individuals, was accomplished, and these FAP biomarkers can be considered as pre-symptomatic biomarkers.

Key words: FAP, TTR, biomarkers, saliva, glycation.

I. Introdução

I. Introdução

O trabalho aqui apresentado resulta da pesquisa, identificação e estudo de biomarcadores na saliva de indivíduos com Polineuropatia Amiloidótica Familiar (PAF) ou Paramiloidose. Os biomarcadores identificados consistem em proteínas diferenciadamente glicadas pelo metilglioxal, formando aductos de argpirimidina e tetra-hidropirimidina (metilglioxal associado a um resíduo de arginina). Por outro lado, também foram estudadas proteínas expressas diferenciadamente em indivíduos com PAF.

De seguida vão ser enumeradas algumas bases teóricas de forma a contextualizar e permitir uma melhor compreensão do estudo apresentado.

1. Polineuropatia Amiloidótica Familiar (PAF)

1.1. Contexto histórico

A Polineuropatia Amiloidótica Familiar (PAF) ou Paramiloidose, conhecida também por “doença dos pezinhos”¹, foi observada pela primeira vez em 1936 pelo Dr. Corino de Andrade, em pacientes dos concelhos de Póvoa de Varzim, Vila do Conde, Esposende e Barcelos, com idades entre os 20 e 35 anos. A descrição formal da doença foi feita em 1952 no artigo *“Uma forma peculiar de Neuropatia Periférica – amiloidose generalizada, familiar, com especial envolvimento dos nervos periféricos”* (revista *Brain*), como uma neuropatia originada pela infiltração de uma substância extracelular amilóide². Neste artigo, Corino de Andrade afirma também que a PAF tem um carácter familiar, observado nas doze famílias examinadas, no entanto, 13 dos 64 doentes não apresentavam qualquer história de doença semelhante (doenças nervosas) nos progenitores, antepassados ou colaterais. Estas observações levaram-no a concluir que a etiologia desta doença poderia estar relacionada não só com causas genéticas, mas também com causas ambientais (particularmente alimentares). Só em 1964 se viria a afirmar um carácter autossómico dominante associado à PAF (Becker, et al., 1964).

Nos anos seguintes verificou-se que a PAF seria uma doença multi-sistémica, manifestando-se no sistema nervoso periférico e autónomo, mas também ao nível do aparelho digestivo, rins, coração e vítreo (olho), progredindo durante 7 a 10 anos até à morte (Luís, 2006).

No início dos anos 60 foram também descritos outros casos em Lisboa (Ribeiro Rosário, et al., 1961), Unhais da Serra (Serra da Estrela) (Antunes, et al., 1963), Figueira da Foz e Cartaxo (Ribatejo). Veio-se a descobrir focos da PAF a nível mundial, com semelhanças aos casos portugueses: no Japão (Arao (Araki, et al., 1968) e Ogawa (Kito, et al., 1980)), cuja ocorrência pode remeter à data dos Descobrimentos Portugueses; na Suécia (Andersson, 1976), neste caso com uma incidência mais tardia, e cuja ocorrência pode remeter às investidas dos vikings pela Península Ibérica. Mais tarde, foi descrito um foco na ilha de Maiorca (Espanha) (Munar-Quès, et al., 1988) e em países de emigração portuguesa, como o Brasil (Julião, et al., 1955;

¹ Devido ao facto dos primeiros sintomas da doença surgirem nos membros inferiores.

² Substância que apresenta birrefringência verde maçã à luz polarizada após a coloração pelo vermelho Congo (Lobato, 2006)

1. Polineuropatia Amiloidótica Familiar (PAF)

Mello, 1959), EUA e França. No entanto, hoje sabe-se que Portugal é o país com maior incidência da PAF, em todo o mundo.

As variadas formas e sintomas com que se apresentava esta doença levaram a uma primeira classificação das amiloidoses hereditárias. A PAF tipo I, de Andrade ou do tipo português; do tipo II, Rukavina ou tipo Indiana (Rukavina, et al., 1956); do tipo III, Van Allen ou tipo Iwoa (Van Allen, et al., 1969) e tipo IV, Meretoja ou tipo Finlandês (Meretoja, 1973).

Em 1978, conseguiu-se demonstrar que a substância amilóide que se deposita nos nervos periféricos e em quase todos os órgãos (excepto os parenquimas hepático e cerebral) era composta por fibras formadas a partir de uma proteína plasmática, a transtirretina (TTR) ou pré-albumina³ (Costa, et al., 1978). Neste caso, esta proteína estaria na forma mutada (valina substituída por uma metionina na posição 30 – TTRV30M). Desde então mais de 80 mutações da TTR foram descritas.

1.2. Sintomatologia

A PAF é uma doença neurodegenerativa (por *dying back*⁴, Figura I-1) caracterizada pela deposição de fibras amilóides em diversos tecidos e, como tal os seus sintomas manifestam-se em vários órgãos e sistemas. Estes sintomas surgem, em cerca de mais de 80% dos casos, antes dos 40 anos (Conceição, 2006) e podem variar consoante o tipo de mutação amiloidogénica, traduzindo-se por fenótipos de neuropatia, cardiomiopatia (Saraiva, et al., 1990), síndrome do túnel cárpico⁵ (Izumoto, et al., 1992), deposição de TTR no vítreo (Salvi, et al., 1993) e envolvimento leptomeníngeo⁶ (Brett, et al., 1999). No entanto, existem algumas mutações sintomaticamente indistinguíveis na descrição inicial da doença.

Na forma portuguesa da PAF, a idade na qual surgem os primeiros sintomas é geralmente precoce, em média $33,5 \pm 9,5$ anos. A penetrância é completa nos focos da doença inicialmente descritos (Vila do Conde e Pova de Varzim) (Sousa, et al., 1995). Nas famílias em que existem casos tardios da doença e portadores idosos assintomáticos, a penetrância é incompleta, o que pode dificultar o diagnóstico. No Japão a doença tem também um início precoce, enquanto que na Suécia tem um início tardio (após o 55 anos), sendo a penetrância baixa (Sousa, et al., 1993).

No início da doença, as manifestações clínicas existentes são de origem neuropática autonómica, seguidas de neuropatia sensitiva e motora, sendo afectadas as fibras não mielinizadas e as fibras pequenas mielinizadas. A neuropatia pode evoluir, lesando todo o tipo de fibras nervosas. As manifestações renais podem ocorrer em certos indivíduos ainda antes da neuropatia e as manifestações cutâneas surgem mais tardiamente.

³ Devido à sua posição relativa à albumina na electroforese.

⁴ Degenerescência axonal disto-proximal.

⁵ Resulta da compressão ou pressão do nervo mediano a nível do punho provocando alterações da sensibilidade (“formigueiros”) no polegar, indicador, médio e metade do anelar.

⁶ Envolvimento do conjunto das meninges “moles”, aracnóide e pia-máter.

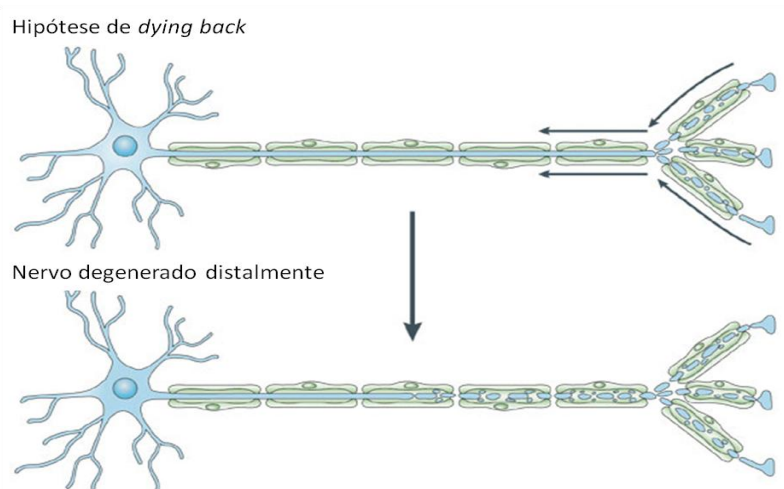


Figura I-1 – Hipótese neurodegenerativa por *dying back*. (adaptado de Coleman, 2005)

A neuropatia autonómica manifesta-se sintomaticamente por disfunção sexual, incontinência do esfíncter, perturbações gastrointestinais e cardiovasculares (Guimarães, et al., 1980). No sistema cardiovascular as manifestações mais frequentes consistem na alteração da condução, ocasionadas pela perturbação simpática e parassimpática. Estas levam a disritmia cardíaca, síncope e morte súbita. Em relação às manifestações gastrointestinais, estas passam por obstipação, diarreia, incontinência fecal. Também são frequentes náuseas e vômitos, que podem eventualmente levar a uma diminuição do índice de massa corporal (IMC). No que diz respeito a manifestações genito-urinárias, estas podem surgir como disfunção vesical, levando à diminuição ou ausência de percepção da sua plenitude, com incapacidade de esvaziamento completo, ou então como disfunção erétil (Conceição, 2006).

A neuropatia sensitiva e motora começa por manifestar-se com perda de sensibilidade térmica e algica nos pés, progredindo de forma ascendente e acompanhando-se de parestesias⁷ e disestesias⁸, que contribuem por sua vez para complicações neurotróficas, nomeadamente úlceras perfurantes plantares e articulações de Charcot⁹. Após o início da sintomatologia surgem alterações motoras (paresia), começando pelos membros inferiores e evoluindo também ascendentemente (Conceição, 2006).

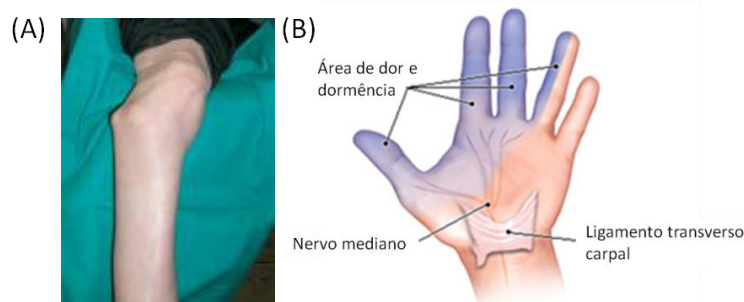


Figura I-2 – Sintomas da PAF. (A) articulações de Charcot; (B) síndrome do túnel cárpico (Conceição, 2006).

Em alguns doentes o défice motor e sensitivo é assimétrico, dependendo da quantidade de depósitos de substância amiloide que se depositam em cada membro (Conceição, 2006).

⁷ Sensação de picadas, formigueiro, impressão de pele empergaminhada, em geral associada a lesões dos nervos periféricos ou da medula espinal.

⁸ Sensibilidade tátil.

⁹ Deterioração das articulações devido a lesões menores, não perceptivas devido a insensibilidade.

2. A PAF e a transtirretina (TTR)

As manifestações oculares ocorrem como consequência da deposição amilóide na conjuntiva e na retina, e mais tarde no vítreo e canal de Schlemm¹⁰. Como tal, caracterizam-se por conjuntivites, anomalias pupilares, glaucoma e opacidades no vítreo (Haraoka, et al., 2002).

As manifestações renais surgem como micro albuminúrias, progredindo para proteinúria, síndrome nefrótica¹¹ e terminando com insuficiência renal, sendo necessária a hemodiálise (Lobato, 1998).

As manifestações cutâneas surgem nos estádios mais avançados na forma de xerose¹², dermatite seborreica, lesões traumáticas e queimaduras, acne, úlceras perfurantes e onicomicoses¹³.

A morte surge, na história natural da doença, 10 a 20 anos após o seu início, geralmente devido a caquexia¹⁴ ou a qualquer intercorrência infecciosa.

2. A PAF e a transtirretina (TTR)

A TTR é hoje conhecida por ser a causa de todos os sintomas que surgem na PAF e levam à morte dos pacientes com esta doença. De seguida vão ser referidas algumas características desta proteína e a sua relação íntima com o desenvolvimento da PAF.

2.1. Gene da TTR

O gene da TTR está localizado numa porção de 7 kb do cromossoma 18 (18q11.2 – q12.1) e é constituído por 4 exões (Whitehead, et al., 1984). A maior parte da sequência da proteína é codificada pelos exões 2, 3 e 4, enquanto que o exão 1 contém a sequência *leader* e os primeiros 3 aminoácidos (Buxbaum, 2007).

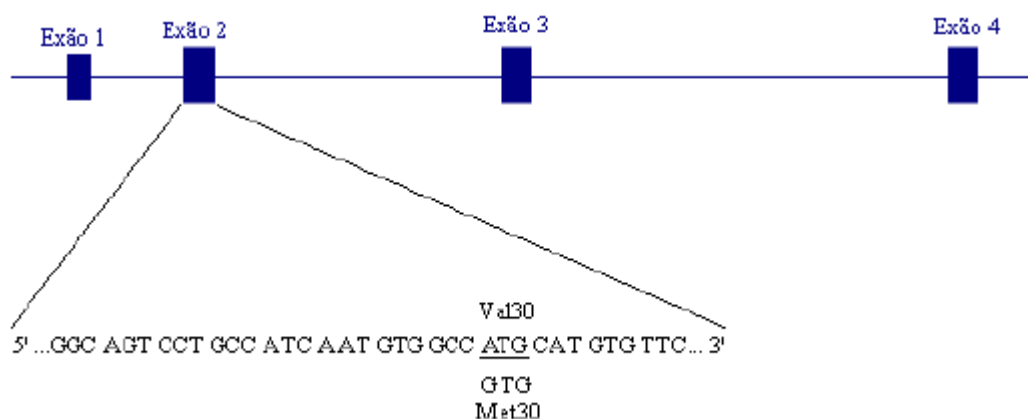


Figura I- 3 - Gene da TTR com mutação na posição V30M.

¹⁰ Recolhe o humor vítreo que é posteriormente incorporado na corrente sanguínea.

¹¹ Edema no nefrónio causado geralmente por proteinúria.

¹² Ressecamento anormal das membranas mucosas.

¹³ Infecção fúngica da placa ungueal que produz unhas opacas, esbranquiçadas, espessadas, friáveis e frágeis.

¹⁴ Estado patológico caracterizado por extrema magreza e mau estado geral grave.

2.2. Expressão da TTR

A expressão da TTR dá-se principalmente no fígado, mas também, em menor quantidade, no plexo coróide (Herbert, et al., 1986), no epitélio leptomeningeal e do pigmento da retina (Getz, et al., 1999). Consequentemente, a TTR está presente no plasma e no líquido cerebroespinal, sendo a proteína mais abundante neste último. Também já foram encontradas quantidades vestigiais de TTR ou do seu mRNA no pâncreas e em tumores endócrinos do estômago, no rim de embrião de ovelha e no cérebro em desenvolvimento (Jacobsson, 1989 a; Jacobsson, et al., 1989 b).

As posições das regiões de regulação de transcrição e os seus elementos variam consoante o local de expressão. No fígado, a expressão da TTR diminui durante o processo de inflamação (proteína de fase aguda negativa), sendo a sua expressão regulada pelo factor de transcrição HNF-3 α (factor nuclear do hepatócito-3 α), que por sua vez é regulado pela IL-6 (isoleucina-6) (Samadani, et al., 1996). Por outro lado, no plexo coróide, não existem os mesmos factores de transcrição que no fígado, logo, não existe alteração da expressão da TTR durante um estado inflamatório sistémico (Schreiber, et al., 1989).

A tradução do mRNA da TTR é realizada em polirribossomas associados à membrana do retículo endoplasmático (RE), não sofrendo modificações pós-traducionais funcionalmente significativas e sendo exportada de seguida. A formação do tetrâmero dá-se também no retículo endoplasmático e varia consoante o tipo de célula (Melhus, et al., 1991) (Bellovino, et al., 1996) (Bellovino, et al., 1998). O tetrâmero liga-se então à RBP (*retinol binding protein*) já associada ao retinol, ainda no retículo. A concentração de RBP no soro depende do nível de TTR e da disponibilidade de retinol (Buxbaum, 2007).

2.3. A proteína e a sua função biológica

A TTR circula na forma de tetrâmero. Este tem uma massa molecular de 54 980 Da e é constituído por quatro subunidades iguais de ≈ 14 kDa, cada uma com 127 aminoácidos (Van Jaarsveld, et al., The Journal of Biological Chemistry) (Kanda, et al., 1974). Cada monómero da TTR é constituído por 8 cadeias- β (A - H), e uma hélice- α entre as folhas E e F (Figura I- 4). Sendo assim, a estrutura do monómero é de barril- β , formado por duas folhas pregueadas- β , uma constituída pelas cadeias DAGH e outra pelas CEBF (Blake, et al., 1978).

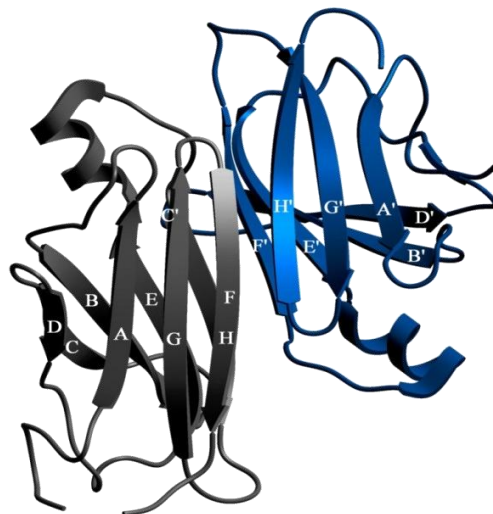


Figura I- 4 – Dímero de TTR (Hamilton, et al., 1993).

2. A PAF e a transtirretina (TTR)

As principais funções da TTR são o transporte de retinol (vitamina A) associado à RBP e também de tiroxina (hormona da tiróide) (Figura I- 5). A sua associação à RBP parece ser importante para impedir a eliminação desta através dos rins. Cada subunidade de TTR tem a capacidade para ligar uma molécula de RBP, no entanto, quando estamos na presença do tetrâmero, apenas dois locais se encontram disponíveis para a ligação da RBP (Buxbaum, 2007). A TTR apresenta três estados de ligação à RBP: não associado a RBP, associado a RBP com retinol (como é segregado no fígado) e/ou associado a RBP sem retinol; todos estes estados são compatíveis com uma ligação à tiroxina (Raz, 1969). A associação da RBP com a TTR leva a uma estabilização desta, podendo haver uma relação entre o local da dissociação da TTR com a RBP, com o local de formação de fibras amilóides (White, et al., 2001).

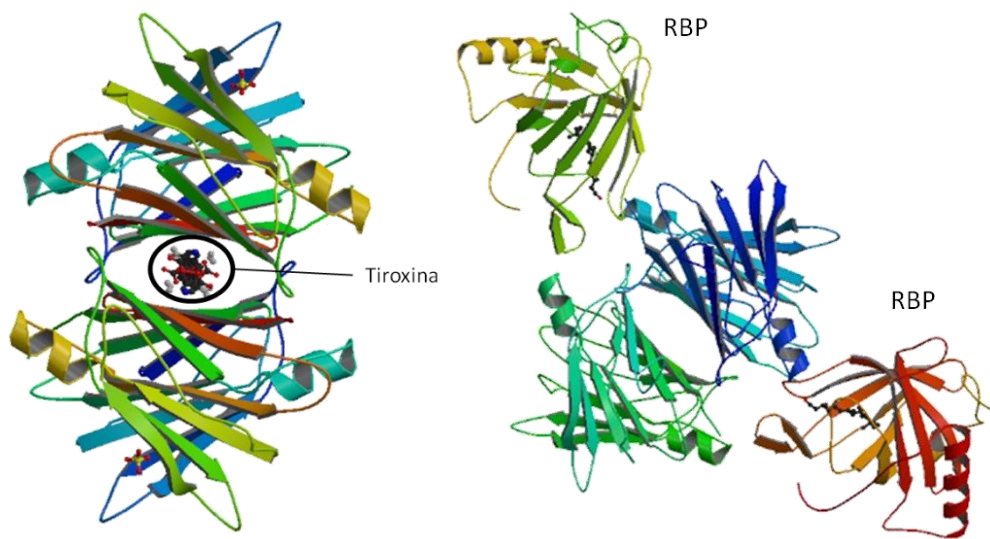


Figura I- 5 – Tetrâmero de TTR associado à tiroxina (esquerda) (PDB-1rlb) e a duas moléculas de RBP (direita) (PDB-2rox).

2.4. Mutações no gene da TTR

Ao longo dos 127 aminoácidos da cadeia de TTR encontram-se distribuídas mais de 100 mutações (Figura I- 6), 98 das quais estão associadas à deposição de amiloide (Connors, et al., 2003). A maioria das mutações resultam de uma substituição pontual, embora exista uma correspondente a uma deleção de um codão inteiro. A maior parte dos indivíduos são heterozigóticos na expressão de uma certa variante, no entanto como está associado um carácter autossómico dominante, uma mutação num dos alelos é suficiente para a manifestação do fenótipo patogénico.

Existe um conjunto de resíduos onde há uma frequência maior de mutações, estes correspondem às posições 45 a 58 (cadeia C), o loop CD e a cadeia D, localizados na extremidade de cada monómero (Serpell, et al., 1996). Este facto pode-se relacionar com uma destabilização do tetrâmero, pois as mutações nestas regiões podem provocar alterações estruturais que levem à exposição de resíduos hidrofóbicos (Kelly, et al., 1994).

A primeira mutação a ser identificada foi a de substituição do resíduo de valina da posição 30 por uma metionina (V30M), em Portugal, e continua a ser a mutação mais comum associada à PAF, a nível mundial. Outras mutações muito comuns a nível mundial são também a T60A, a L58H e a V122I.

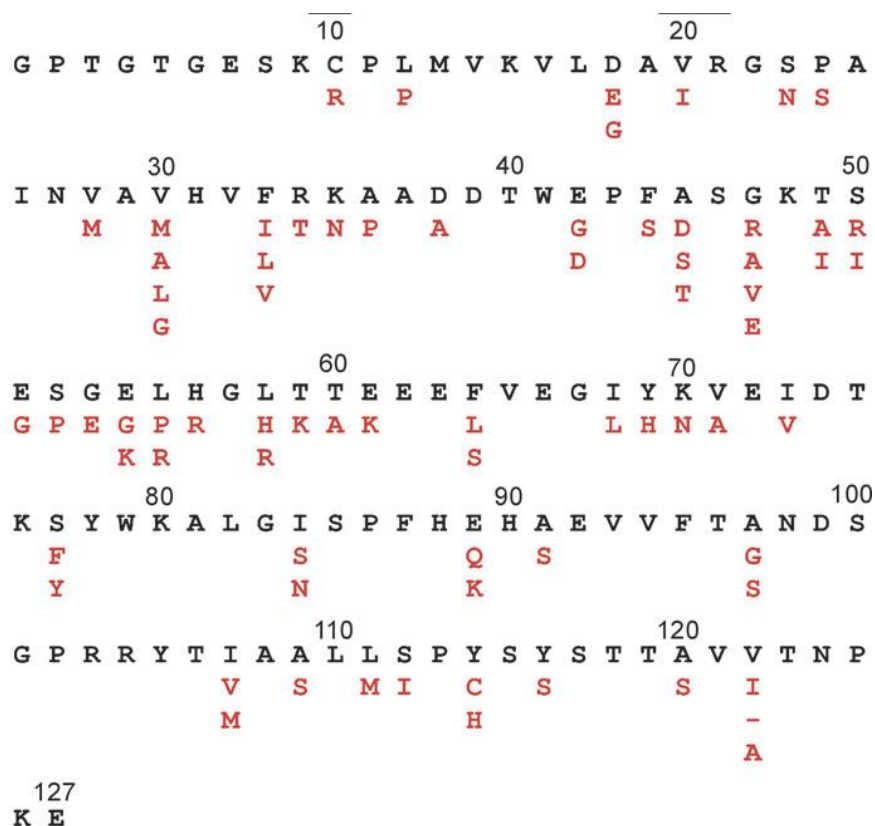


Figura I- 6 – Sequência de aminoácidos da TTR humana com algumas das mutações já identificadas (a vermelho) (Hou, et al., 2007).

As mutações podem ser divididas em amiloidogénicas e benignas (ou não amiloidogénicas), visto que foram encontradas duas mutações que promovem uma maior estabilidade do tetrâmero em comparação com a TTR *wild type* (wt) e com outras variantes. A variante TTR T119M estabiliza um tetrâmero híbrido (com monómeros V30M/T119M), pois aumenta a afinidade entre a TTR e o seu ligando, tiroxina (Hammarstrom, et al., 2003). Foi ainda demonstrado que a variante T119M consegue suprimir a manifestação da doença *in vivo* quando o gene está presente num dos alelos (Coelho, et al., 1993). A outra variante, TTRR104H, também tem um efeito protector semelhante à anterior, por isso pensa-se que seja conseguido através do mesmo mecanismo (Almeida, et al., 2000).

Os diversos sintomas associados à PAF também se relacionam de certa forma com o tipo de variantes presentes em circulação. Alguns sintomas são bastante comuns e estão relacionados com diversas variantes, nomeadamente a neuropatia periférica, ou o envolvimento leptomeningial, ou a síndrome do túnel cárpico, ou a disfunção cardíaca, foram recentemente associados a determinadas variantes.

Os mutantes D18G e A25T, por exemplo, estão associados à deposição nas leptomeninges. Estes são bastante instáveis, por isso podem formar agregados facilmente. No entanto, como são produzidos em pequenas quantidades no fígado (sabendo que a fibrilogénese é dependente da concentração de TTR (Buxbaum, 2007)), não conseguem provocar uma deposição sistémica. Por outro lado, quando são segregados no plexo coróide estão associados à tiroxina. Esta estabiliza o complexo até que este atinge o fluído cerebrospinal, começando a agregar-se e posteriormente a depositar-se nas leptomeninges (Hammarstrom, et al., 2003). Mesmo assim a deposição dos agregados amilóides não determina a disrupção do tecido onde isso acontece, pelo que existem tecidos mais susceptíveis do que outros.

2. A PAF e a transtirretina (TTR)

As variantes T60A, L111M e V122I estão geralmente associadas a manifestações cardíacas intensas. Todas estão aparentemente associadas a uma distribuição geográfica restrita, pelo que é difícil inferir se de facto os sintomas se devem a aspectos genéticos ou ambientais. No entanto, tem sido observado as mesmas manifestações em dois pacientes de áreas geográficas diferentes (Svendsen, et al., 1998).

A previsão dos sintomas da PAF apenas a partir do conhecimento da mutação adquirida está envolvida em muita controvérsia, pois, tendo em conta a variedade extensa de sintomas, é possível que ainda não estejam completamente descritos, assim como as mutações que os acompanham.

2.5. Processo de amiloidogénese de TTR

O mecanismo pelo qual as fibras amilóides de TTR se formam ainda é desconhecido, no entanto existem algumas hipóteses que tentam explicar o processo.

Em primeiro lugar, o facto de a estrutura nativa da TTR já ser maioritariamente constituída por folhas- β , pode apontar para um grande potencial amiloidogénico (Blake, et al., 1974), já que as estruturas fibrilares também têm uma estrutura predominantemente em folhas- β . Por outro lado, já foi verificada a existência de uma relação inversa entre o potencial amiloidogénico e a estabilidade do tetrâmero de TTR. Isto é, a formação de fibras amilóides pode ser iniciada pela destabilização do tetrâmero, o que leva à sua dissociação em monómeros com baixa estabilidade conformacional, e consequentemente podem levar à formação de espécies *unfolded* com elevada tendência para agregar (Quintas, et al., 2001).

Desta forma, alguns estudos *in vitro* indicam que a unidade a ser adicionada às fibras amilóides maduras é o monómero, e não o dímero ou tetrâmero (Cardoso, et al., 2002). Outro estudo *in vitro* descreve um equilíbrio entre os monómeros, os depósitos não fibrilares e os fibrilares, afirmando que existem ciclos de compressão e descompressão, nos quais as fibras se podem dissociar, funcionando como “fonte” de proteína não fibrilar (Foguel, et al., 2003).

Em estudos *in vivo*, foi possível detectar a presença de agregados não fibrilares da variante V30M nos nervos de pacientes PAF, antes das fibras amilóides serem visíveis em estádios precoces da doença. Isto leva-nos a supor que estes estados de agregados precedem as protofibras, bem como as fibras amilóides (Sousa, et al., 2001 a; Sousa, et al., 2001 b).

O factor que despoleta agregação não pode ser única e exclusivamente a mutação na TTR *wt*, pois se assim fosse as manifestações da doença apareceriam mais cedo e a proteína nativa não faria parte dos agregados. Sendo assim devem existir outros factores que influenciam a desestabilização da estrutura tetramérica da TTR e promovem a sua agregação e deposição, como por exemplo componentes detectados nas fibras, como os proteoglicanos e o componente P (SAP¹⁵) (Snow, et al., 1987), ou então factores ambientais, como a oxidação associada ao envelhecimento (Levine, et al., 1996) ou a glicação (Gomes, et al., 2005).

Foram recentemente identificados produtos avançados de glicação (AGE – *advanced glycation end-products* ou produtos avançados de glicação), nomeadamente a argpirimidina (argp), nas fibras amilóides de pacientes PAF (Gomes, et al., 2005), demonstrando uma possível relação entre a glicação e a formação e deposição de fibras amilóide.

¹⁵ Glicoproteína globular pentamérica produzida no fígado, constituinte principal dos agregados amilóides (Pardo Mindán, 1996).

A glicação é um processo não enzimático que permite a formação de aductos entre os resíduos proteicos de arginina ou lisina (por vezes os dois em simultâneo) e uma molécula de metilglioxal, originando, por exemplo, a argpirimidina e a tetra-hidropirimidina (THP), respectivamente (Nemet, et al., 2006). O metilglioxal é maioritariamente formado a partir dos processos de glicólise e de peroxidação lipídica (Figura I- 7) (Nemet, et al., 2006), sendo possível a influência de factores externos (como a ingestão de glucose) na formação de mais AGEs. Vários estudos indicam que a glicação afecta o envelhecimento fisiológico e várias doenças neurodegenerativas, tais como Alzheimer e Parkinson (Kikuchi, et al., 2003), pelo que poderá também influenciar a PAF.

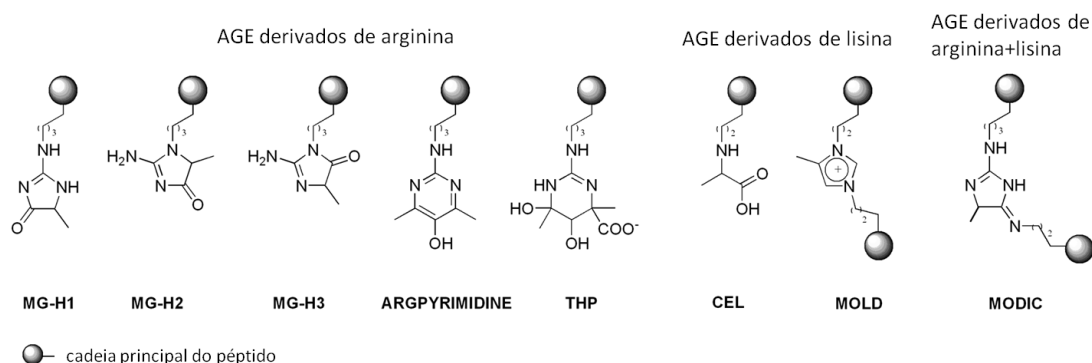


Figura I- 7 – Produtos avançados de glicação (AGE) formados a partir da reacção entre o metilglioxal e os resíduos proteicos de arginina e lisina. MG-H1 - N₆-(5-methyl-4-imidazol-2-yl)-L-ornithine; MG-H2 - 2-amino-5-(2-amino-5-hydro-5-methyl-4-imidazol-1-yl)pentanoic acid; MG-H3 - 2-amino-5-(2-amino-4-hydro-4-methyl-5-imidazol-1-yl)pentanoic acid; THP - N₆-(4-carboxy-4,6-dimethyl-5,6-dihydroxy-1,4,5,6-tetrahydropyrimidine-2-yl)-L-ornithine; CEL - N_ε-(1-carboxyethyl)lysine; MOLD - MG-derived lysine dimer; MODIC - 2-ammonio-6-({2-[4-ammonio-5-oxido-5-oxopentyl)amino]-4-methyl-4,5-dihydro-1H-imidazol-5-ylidene}amino)hexanoate (adaptado de Nemet, et al., 2006)

Alguns destes factores também podem justificar o facto de a deposição de TTR se dar preferencialmente em determinados tecidos, já que esses factores influenciam o ambiente de cada tecido e estes podem determinar a deposição de TTR. São exemplo os depósitos cardíacos, que estão associados à membrana basal (Sawabe, et al., 2003).

Em suma, acredita-se que existem factores intrínsecos e extrínsecos à TTR que fazem com que a sua estrutura tetramérica perca a estabilidade e se dissocie em monómeros. Estes formam então agregados não amilóides que posteriormente se associam em protofibras e, finalmente, em fibras amilóides que se depositam em diversos tecidos (Figura I- 8). Existem ainda algumas evidências de que os dímeros heteroméricos (wt e mutantes) também possam constituir *building blocks* das fibras amilóides, já que foram observadas ligações de dissulfido entre subunidades em pacientes heterozigóticos e homozigóticos (Thylen, et al., 1993).

2. A PAF e a transtirretina (TTR)

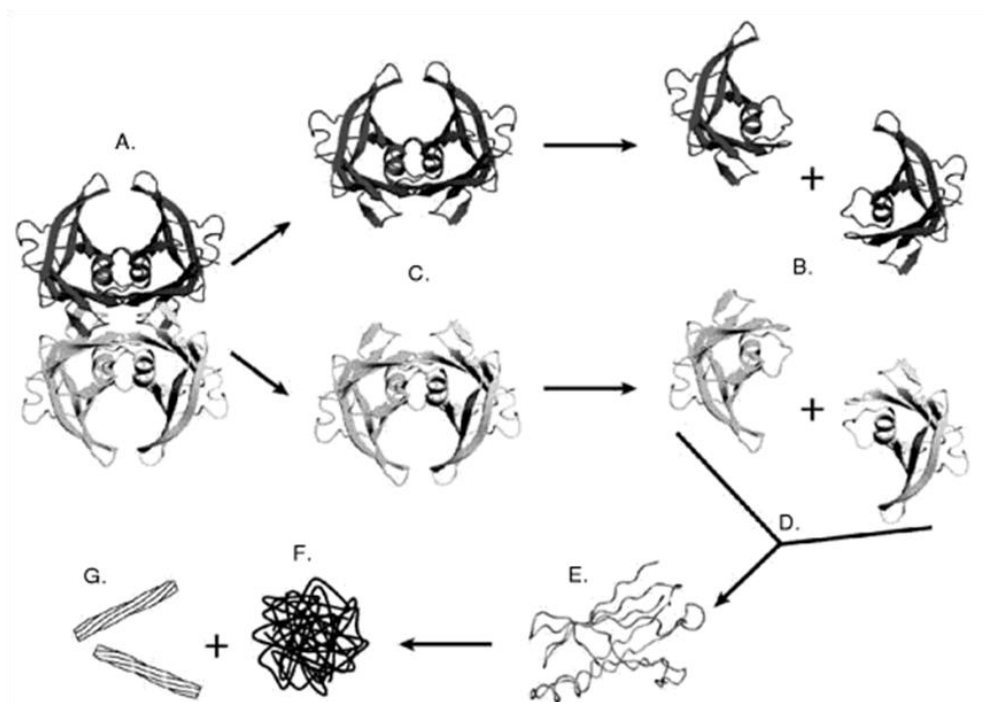


Figura I- 8 – Modelo do mecanismo de formação de fibras amilóides de TTR. (A) tetrâmero de TTR; (B) monómeros de TTR; (C) dímeros de TTR; (D) processo de *misfolding*; (E) monômero *misfolded*; (F) agregados esféricos de oligômeros; (G) fibras amilóides (Buxbaum, 2007).

2.6. Toxicidade induzida pelos depósitos amilóides de TTR

O mecanismo pelo qual a TTR induz toxicidade e leva à morte celular dos vários tecidos ainda não está totalmente conhecido.

Foi determinado que apenas fibras amilóides de TTR com menos de 100 kDa eram tóxicas, ou seja, que espécies diméricas ou monoméricas, tinham efeitos neurotóxicos. Depois, foi determinado que esses efeitos parecem ser devido a características estruturais e não aos aminoácidos que constituem a proteína, já que proteínas sem semelhanças com a sequência da TTR, como a gelsolina e a apolipoproteína AI, podem originar também a PAF (Ando, et al., 2005). Foram identificados alguns processos derivados da presença de TTR: diminuição da actividade mitocondrial, alteração da sinalização mediada pela *mitogen-activated protein* cinase (MAPK), activação de caspases e indução de stress no RE (Reixach, et al., 2004; Monteiro, et al., 2006; Teixeira, et al., 2006).

Foi observado em estudos *in vitro* que os agregados de TTR, e não as fibras amilóides, são capazes de induzir a expressão de citocinas pro-inflamatórias (em culturas de neurónios sensitivos e em células de Schwann) (Sousa, et al., 2001 b), bem como o aumento da produção de citocina anti-inflamatória IL-10 (Sousa, et al., 2005), sugerindo um balanço entre os mecanismos pró e anti-inflamatório, não havendo infiltração de macrófagos. *In vivo*, as observações foram semelhantes sendo que também foram detectados marcadores de stress oxidativo (Sousa, et al., 2001 b).

Todas estas respostas celulares são reguladas por receptores, como o receptor para produtos avançados de glicação (RAGE). Este foi descrito como receptor para moléculas precursoras de fibras amilóides, bem como para agregados de TTR (Bucciarelli, et al., 2002). Sabe-se que o RAGE recruta mecanismos de transdução de sinal que resultam em respostas inflamatórias, como por exemplo: regulação do factor nuclear k-B (NF-kB), a sinalização do

MAPK e do cinase de N-terminal de Jun (JUNK) (Ding, et al., 2005), os quais podem ser afectados na PAF *in vivo* (Monteiro, et al., 2006) (Figura I- 9). Surgiu ainda um estudo que relacionou um aumento da expressão de RAGE com a evolução da doença (Sousa, et al., 2000) (*in Advanced Glycation end products (AGE) and the receptor for AGE are present in familial amyloidotic polyneuropathy patients' gastrointestinal tract but do not induce NF-kB activation, 2002; in The role of RAGE and AGE on kidney failure in patients with familial amyloid polyneuropathy, 2002*).

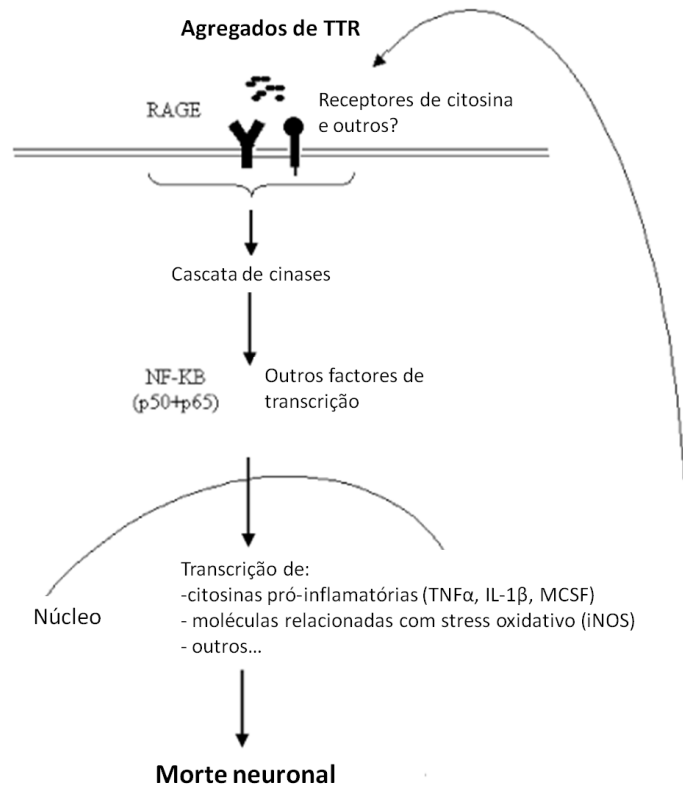


Figura I- 9 – Hipótese para a sinalização molecular envolvida na neurodegeneração na PAF.

Noutros estudos, já foi considerada a hipótese de que a desregulação da homeostase do cálcio também se relaciona com a toxicidade provocada pelas fibras amilóides na PAF, à semelhança do que ocorre na doença de Alzheimer. Como consequência do stress oxidativo no RE referido anteriormente, foi observada a libertação de cálcio dos seus locais de armazenamento no RE (Teixeira, et al., 2006). Por outro lado, Hou *et al.* verificou que a ligação da TTR à membrana plasmática da célula de neuroblastoma provocava a disrupção da sua fluidez e isso estava, por sua vez, associado ao grau de toxicidade (Hou, et al., 2005). Isto indica a possibilidade da disrupção das jangadas lipídicas corresponder à localização de canais de cálcio dependentes de voltagem (O’Connell, et al., 2004), provocando a activação destes e a entrada de cálcio (Hou, et al., 2007; Davies, et al., 2006).

Noutra abordagem, é considerada a disrupção da interacção célula de Schwann-neurónio, sendo que nos pacientes PAF há uma perturbação das fibras de colagénio e da membrana basal, que sustentam essa interacção. Este facto pode influenciar indirectamente o funcionamento neuronal, nomeadamente na redução da expressão de factores neurotróficos (Sousa, et al., 2003), essenciais à sobrevivência, diferenciação, manutenção e regeneração axonal dos neurónios.

3. A PAF e as glândulas salivares

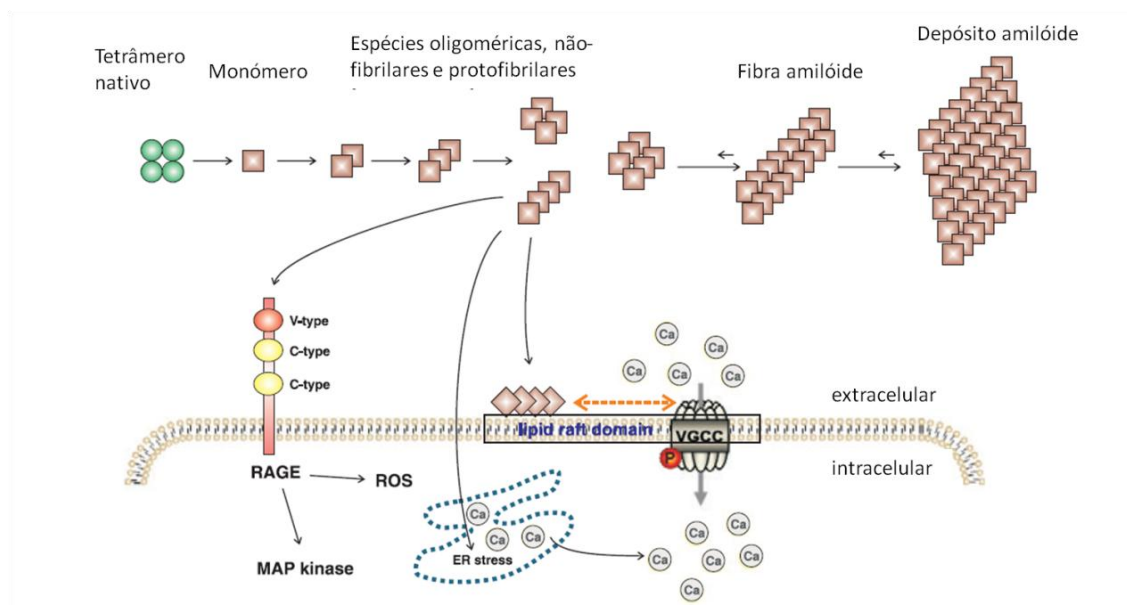


Figura I- 10 – Mecanismo hipotético que demonstra as diferentes formas pelas quais a TTR pode causar a disfunção neuronal (adaptado de Hou, et al., 2007).

3. PAF e glândulas salivares

3.1. Depósitos de TTR nas glândulas salivares

O facto de ter sido previamente demonstrado que a deposição da TTR mutada é sistémica, levantou possibilidades em relação à utilização de diversos tecidos para o diagnóstico da PAF. A biopsia de glândulas salivares labiais já foi utilizada para este fim por constituir um método minimamente invasivo e por conter depósitos de TTR que se relacionam com a sua deposição no sistema nervoso periférico (Sousa, et al., 2004). Numa fase pré-sintomática, estes depósitos de TTR parecem promover respostas de stress oxidativo, de apoptose e inflamação, pelo que já foram indicados alguns biomarcadores resultantes destes eventos, para a avaliação de tratamento em PAF, é o caso do hidroxinonenal (HNE) (marcador para a peroxidação lipídica), da 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) (marcador para danos oxidativos do DNA) e do receptor Fas (marcador para a apoptose) (Macedo, et al., 2007).

Sendo assim, é possível que, devido a estas condições, exista um funcionamento alterado das glândulas salivares, passível de se reflectir na própria saliva por elas produzida. Deste modo, será inevitável verificar se existem e quais são as alterações na composição da saliva total de indivíduos com PAF.

3.2. Saliva Total

3.2.1. Definição

A saliva total é um fluído que pode ser recolhido a partir da boca, tendo sido produzido pelas glândulas salivares (maiores – parótida, sublingual (SL), submandibular (SM) (Figura I- 11) – e menores – von Ebner e Blandin-Nuhm) e misturado com bactérias, fungos, vírus, secreções

nasais e bronquiais, refluxo gastrointestinal, após a sua libertação na boca (Chiappin, et al., 2007). Resumidamente, as suas funções passam pela manutenção dos dentes, pelo auxílio na digestão e na degustação e pela defesa anti-viral, anti-fúngica e anti-bacteriana (Pink, et al., 2009).

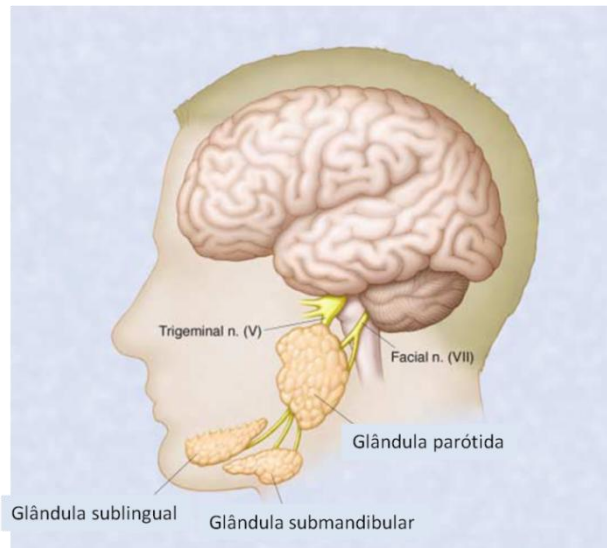


Figura I- 11 – Localização das três glândulas salivares principais. (adaptado de Wong, 2006)

A saliva é composta essencialmente por fluido intersticial proveniente dos capilares sanguíneos adjacentes aos ductos das glândulas salivares. É constituída por 98 % de água e 2 % de outros componentes, como electrólitos (Na, K, Ca, Mg, carbonatos de hidrogénio, fosfatos), muco com mucopolissacáridos e glicoproteínas, substâncias anti-sépticas (peróxido de hidrogénio, imunoglobulina A – IgA) e vários enzimas (α -amilase, lisozimas, lipase lingual) (Pink, et al., 2009). Alguns destes componentes provêm dos capilares sanguíneos, nomeadamente via *gap junctions* (água, iões, hormonas – catecolaminas e esteróides), ultra-filtração do plasma sanguíneo (fluído crevicular ou directamente da mucosa oral) (albumina), por difusão passiva (hormonas esteróides), ou por transporte activo (Chiappin, et al., 2007) (Figura I- 12).

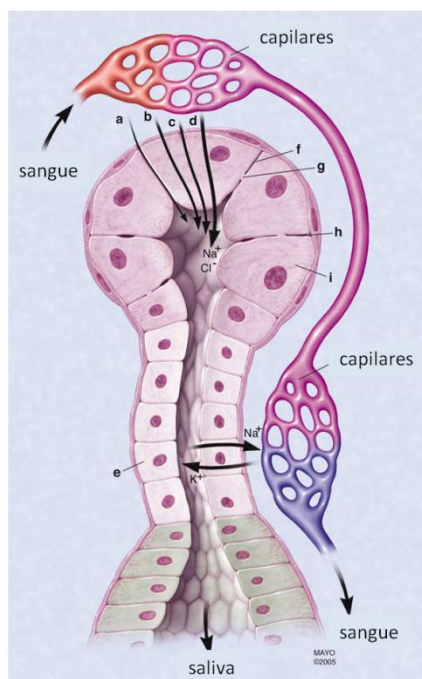


Figura I- 12 – Mecanismo de transporte de proteínas e iões do soro para os ductos das glândulas salivares. a) transporte activo de determinados compostos; b) difusão passiva de compostos lipossolúveis; c) filtração simples de determinados compostos; d) células acinar transportam activamente o sódio (Na⁺) para o interior do ducto; e) células do ducto transportam activamente o Na⁺ para o sangue; f) membrana celular; g) poro na membrana celular; h) espaço intracelular; i) célula acinar. (adaptado de Wong, 2006)

3. A PAF e as glândulas salivares

Cada glândula salivar segrega um tipo de saliva diferente, com proteínas, sais e iões característicos. As glândulas parótida e von Ebner segregam um fluido seroso, rico em amilase, proteínas ricas em prolina e fosfoproteínas; por outro lado as glândulas Blandin-Nuhm segregam fluido mucoso, rico em mucinas; as glândulas sublingual e submandibular produzem fluidos sero-mucosos (Chiappin, et al., 2007; Pink, et al., 2009).

As secreções de cada glândula são controladas pelo sistema nervoso autónomo: a produção da parte serosa é regulada pelo sistema nervoso simpático, enquanto que a produção da parte mucosa é regulada pelos sistemas nervosos simpático e parassimpático. A variação quantitativa e qualitativa da saliva depende do olfacto, da estimulação gustativa, da mastigação, do estado psicológico e emocional, de drogas, da idade, da higiene oral, do exercício físico e de influências hereditárias. É exemplo desta variação o aumento da produção de proteínas totais e especialmente de α -amilase após uma refeição (Chiappin, et al., 2007).

Em relação ao proteoma da saliva, este já foi estudado com recurso a diversos métodos e hoje em dia foram identificadas mais de 1000 proteínas, algumas também presentes no plasma (Yan, et al., 2009). As proteínas mais abundantes, bem como as suas funções e origem estão presentes na Tabela I-3 (Chiappin, et al., 2007).

Tabela I-3 - Proteínas salivares mais abundantes. SM – glândula submandibular; SL – glândula sublingual; PRPs – proteínas ricas em resíduos de prolina (Chiappin, et al., 2007).

Proteínas	Origem	Funções
α -amilase	-	Digestão de amido
Albumina	Plasma	(Principalmente devido a fuga do plasma)
Grupo das cistatinas	SM> SL	Anti-microbial (inibidor de proteinases de cistaina)
Histatina	Plasma	Anti-fúngico
IgA	Linfócitos B	Anti-microbial
Lactoferrina	Mucoso> seroso	Anti-microbial
Lisozima	SL>SM, Plasma	Anti-microbial
Grupo das mucinas	Glândulas mucosas	Lubrificação
PRPs	Plasma	Associação a bactérias e a taninos provenientes da dieta
Staterina	-	Associação a Ca^{2+}
Transferrina	Plasma	-

O estudo das proteínas e de outros componentes salivares permitiu a identificação de variações entre estados de saúde normais e de doença, incentivando à utilização da saliva como fluido de diagnóstico.

3.2.2. Saliva como fluido de diagnóstico

A composição dos componentes salivares encontra-se alterada em diversas patologias. No síndrome de Sjögren e no cancro da boca é possível observar um aumento dos níveis de várias proteínas (Hu, et al., 2007 a; Hu, et al., 2007 b). Nos pacientes diabéticos já foi observado um aumento dos níveis de amilase e de IgA (Aydin, 2007; Hagewald, et al., 2003). Nos casos de fibrose cística foram observadas alterações na glicosilação das mucinas salivares (Shori, et al., 2001). Isto indica a saliva como um potencial fluido de diagnóstico e de monitorização da saúde.

A saliva é já utilizada como fluído de diagnóstico para doenças sistémicas e relacionadas com a cavidade oral e com as glândulas salivares, como por exemplo: o cancro da boca (através do transcrito), onde este método foi já considerado mais preciso do que o diagnóstico através do soro (Li, et al., 2006); o síndrome de Sjögren (Pedersen, et al., 2005); infecções virais e bacterianas, bem como a avaliação da imunidade em resposta à vacinação, através de análise de IgG ou análise directa de DNA (Chiappin, et al., 2007). A saliva também tem sido considerada útil a nível forense, através da análise do DNA das células bucais (Ng, et al., 2006), na detecção de substâncias de abuso no organismo (álcool, anfetaminas, barbituratos, benzodiazepinas, cocaína, LSD, opióides) (Shirtcliff, et al., 2003) e na monitorização de fármacos, de forma a dosear correctamente a sua administração (Guo, et al., 2007).

3.2.2.1. Vantagens e desvantagens da utilização da saliva versus outros fluidos muito utilizados: soro ou plasma

A saliva apresenta muitas vantagens na sua utilização como fluido de diagnóstico em relação ao soro ou plasma, ou até à urina. No entanto, também apresenta algumas desvantagens.

As vantagens relacionam-se principalmente com o facto de a saliva ser fácil de recolher, pois não necessita de assistência profissional e está sempre disponível. É também fácil de armazenar e transportar, tornando-se muito económica; a sua manipulação torna-se mais simples, pois não coagula como o sangue, e o único cuidado será manter a amostra refrigerada. As amostras de saliva também são muito menos complexas que as de plasma.

Para os pacientes o processo de recolha é mais cómodo, pois não é tão invasivo, reduzindo a ansiedade e o desconforto, que muitas vezes impedem a recolha de sangue em quantidades razoáveis. Isto vai facilitar também uma monitorização do estado do paciente ao longo do tempo. A sua utilização acaba por ser mais segura no que diz respeito à prevenção da transmissão de doenças, como é o caso da SIDA e da hepatite.

Por fim, como já foi referido, a saliva tem alguma sobreposição com o sangue no que diz respeito a várias espécies proteicas (cerca de 330 proteínas) (Figura I- 13) (Yan, et al., 2009) devido à sua filtração para os ductos salivares, consequentemente deverá ser um excelente substituto.

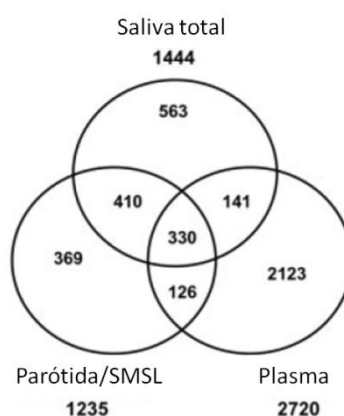


Figura I- 13 – Número de proteínas pertencentes à saliva total e saliva das glândulas parótida, sublingual (SL) e submandibular (SM), e do plasma, e suas sobreposições (adaptado Yan, et al., 2009).

4. Detecção e diagnóstico: importância dos biomarcadores

As desvantagens e dificuldades que surgem na utilização deste fluido também podem ser encontradas no plasma ou soro, como por exemplo as variações dependentes do ritmo circadiano, do estado de saúde oral e exercício físico. Estas podem ser contornadas com a uniformização do horário de recolha, ou com a recolha em jejum, embora o plasma consiga ser mais estável neste aspecto (Chiappin, et al., 2007). Os microrganismos presentes e os seus proteases podem contribuir para uma contaminação das amostras, e também para a degradação proteica, impossibilitando algumas identificações (Esser, et al., 2008). Uma grande desvantagem da saliva é o facto de alguns analitos que poderão ser úteis para análise surgem em pequenas quantidades em relação ao soro ou plasma (Miller, 1994).

4. Detecção e diagnóstico: importância dos biomarcadores

O diagnóstico da PAF passa pela investigação clínica dos sintomas presentes, nomeadamente com o recurso a estudos neurofisiológicos. No entanto, só é confirmado perante um estudo molecular de identificação do tipo de mutação existente em cada caso.

Os critérios de diagnóstico inicialmente estabelecidos por Corino de Andrade (Andrade, 1951 a; Andrade, 1952; Andrade, 1951 b) baseavam-se essencialmente no princípio da hereditariedade, e numa idade jovem de apresentação de sintomas. Estes seriam a neuropatia autonómica, sensitiva e motora, caracterizada e derivada da presença de substância amilóide nos mais variados tecidos. No entanto, uma grande variedade de sintomas inespecíficos e a existência de alguns casos esporádicos de doentes sem história familiar tornou o seu diagnóstico sempre difícil.

O diagnóstico neurofisiológico assenta essencialmente na técnica de electromiografia (EMG)¹⁶, que apesar de conseguir identificar algumas características da doença já mencionadas, por vezes falha na identificação de anomalias em certos indivíduos com a doença (de Carvalho, 2006).

A base do diagnóstico molecular assenta na identificação da transtirretina mutada, através de técnicas bioquímicas e genéticas. Estes testes são hoje em dia efectuados a partir de blastócitos retirados de um embrião na fase de mórula, para diagnósticos pré-natais e pré-implantatórios (Almeida, et al., 1990; Almeida, et al., 2005).

Um dos métodos utilizados numa abordagem genética de diagnóstico molecular implica a utilização de enzimas de restrição, como a NsiI e a EcoT221 (para a mutação V30M, transversão G→A). Estas permitem a formação de fragmentos do gene da TTR facilmente detectados através da técnica de *restriction fragment length polymorphism* (RFLP). Os fragmentos são sujeitos a uma *polymerase chain reaction* (PCR - reacção em cadeia da polimerase) e a electroforese, revelando dois fragmentos adicionais (Figura I-14). Para cada mutação podem ser utilizadas diferentes enzimas de restrição, dependendo da transversão ocorrida. Também são utilizadas técnicas como a *single stranded conformational polymorphism* (SSCP) (Torres, et al., 1994); a sequenciação para a pesquisa de mutações em casos seleccionados, aliando a electroforese capilar à detecção por fluorescência (Pinho e Costa, 2006).

¹⁶ Técnica que regista as variações das correntes que se produzem nos músculos em repouso ou durante a contracção muscular.

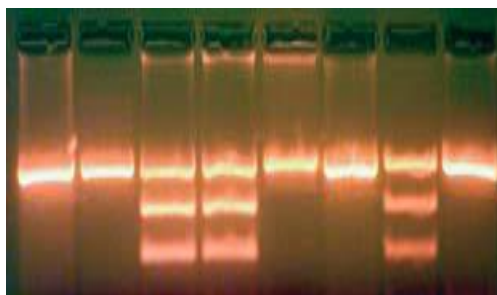


Figura I- 14 – RFLP.PCR do exão 2 do gene da TTR. As *lanes* com três bandas correspondem aos indivíduos com PAF, pois sofreram corte pela enzima EcoT22I (Pinho e Costa, 2006).

A abordagem bioquímica no diagnóstico molecular tem vindo a evoluir, sendo um dos primeiros métodos a ser utilizado o de fragmentação triptica da transtirretina do soro. Neste, utiliza-se o brometo de cianogénio (CNBr) que reage com os resíduos de metionina, fragmentando a proteína nas posições correspondentes. Este método é aplicado para a identificação da variante V30M, conseguindo identificar-se um fragmento correspondente ao segmento 30-127 da TTR, por análise electroforética e western-blot (Figura I-15) (Saraiva, et al., 1985). Outra variante do mesmo método é a realização de uma electroforese normal com amostras de soro, sendo que de seguida é excisada a banda correspondente à TTR, incubada com CNBr e sujeita a nova corrida electroforética, separando e mostrando os vários fragmentos da TTR (Saraiva, et al., 1989).

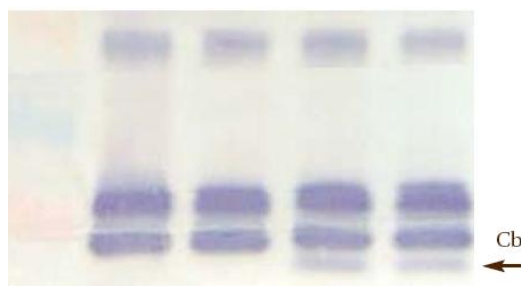


Figura I- 15 - Western Blotting de duas amostras de indivíduos sem PAF (esquerda) e outras duas de indivíduos com PAF (direita). Presença de uma banda no fundo das *lanes* dos indivíduos com PAF, originada a partir da fragmentação com CNBr (Pinho e Costa, 2006).

Outros métodos, como a focagem isoelectrica (Altland, et al., 1986) e a detecção por *enzyme linked immuno sorbent assay* (ELISA) (utilizando anticorpos com especificidade conformacional) (Costa, et al., 1993), têm-se mostrado úteis na análise de grandes séries de amostras a baixo custo. Também tem sido utilizada a espectrometria de massa para a identificação e caracterização de mutações a partir de amostras de soro (da Costa, et al., 2009; Tachibana, et al., 1999; Lim, et al., 2002) e saliva (da Costa, et al., 2010).

Recentemente têm surgido investigações na tentativa de encontrar biomarcadores para o diagnóstico da PAF e também para o seguimento terapêutico da doença (Macedo, et al., 2007). São exemplo os marcadores de stress oxidativo: HNE, 8-OHdG, Grx1 (glutaredoxina); e de apoptose: Fas, Caspase-8 e Bax, já mencionados. Estes marcadores de stress oxidativo e de apoptose encontravam-se aumentados nos tecidos analisados (glândulas salivares de pacientes PAF e estômago e DRG (*dorsal root ganglia*) de modelos de ratos transgénicos com deposição não fibrilar de TTR) mostrando correlação com a deposição de TTR.

5. Tratamento: passado, presente e futuro

A investigação de novas formas de diagnóstico pré-clínico e pré-natal e a junção das existentes, de forma a impedir atempadamente a evolução da doença são pontos extremamente importantes. Os doentes ou familiares devem poder tomar decisões informadas, nomeadamente quando se trata do diagnóstico pré-natal, que pode ajudar os progenitores a decidir por uma interrupção da gravidez ou por uma fertilização *in vitro* (diagnóstico pré-implantatário). Desta forma, o presente trabalho contribuirá para evolução do conhecimento neste sentido.

5. Tratamentos: passado, presente e futuro

Como já foi descrito em alíneas anteriores, a PAF é uma doença onde vários órgãos são afectados e é caracterizada por múltiplos sintomas, sendo que uma das formas de tratamento deste tipo de doença crónica é o atenuamento dos sintomas.

Por outro lado, a única forma de tratamento que, no presente, consegue parar a evolução da PAF é o transplante hepático.

Visto que 90% da TTR é produzida pelo fígado, a substituição deste órgão faz entrar em circulação a TTR *wt* que não origina substância amilóide, o que impede a progressão da doença ou até eventualmente promove a sua regressão dos sintomas. Em 1990, foi realizado o primeiro transplante hepático para o tratamento da PAF, no Hospital de Huddinge, Instituto de Karolinska de Estocolmo (Holmgren, et al., 1991). Surge mais tarde outra modalidade de transplante, a “transplantação hepática auxiliar”, em que só uma porção do fígado é transplantada. No entanto, esta só serve como intermediário antecedendo a excisão do fragmento hepático doente (Takei, et al., 2005).

As publicações precedentes demonstraram que o transplante hepático pára a progressão da doença (Holmgren, et al., 1991), à diminuição dos depósitos viscerais e perineurais e à melhoria do quadro clínico, sendo que estes resultados dependem da sua detecção precoce. Estatisticamente, a sobrevida aos 5 anos após o transplante é de 90%, e a sobrevida no caso dos transplantes realizados em indivíduos com a variante V30M é cerca de 20% superior quando comparado com os casos com as restantes variantes. A melhoria clínica dos sintomas sensoriais, motores, gastrointestinais ocorre em cerca de 35% dos casos (Furtado, 2006).

Em 1996, surgiu um avanço no procedimento destes transplantes hepáticos. A ideia surgiu com o intuito de não desperdiçar os fígados PAF, mas sim utilizá-los para o transplante em pacientes com tumores hepáticos primitivos ou neuro-endócrinos, ou cirroses alcoólicas ou virais (C ou B), que teriam poucas hipóteses de sobrevivência. Teoricamente, os receptores do fígado PAF só viriam a manifestar sintomas num espaço de tempo de 20 a 30 anos, sendo este o espaço de tempo correspondente ao aparecimento dos sintomas nos pacientes com PAF.

Assim, foi realizado o primeiro transplante sequencial (ou dominó), no Hospital da Universidade de Coimbra, onde o fígado de um paciente PAF foi transferido para um paciente com metástases hepáticas isoladas de tumor do cólon. O paciente com PAF sobreviveu até hoje, mas o paciente que recebeu o fígado faleceu passado um ano. Actualmente, a sobrevida é de 80% aos 12 meses e de 75% aos 60 meses, para doentes com cirrose e entre 80 e 65% para os pacientes com diversos tumores. De facto, verificou-se que a variante V30M era detectada no sangue dos receptores desde os primeiros 3 meses e que após 3 anos já são

detectados depósitos de TTR amilóide, na pele ou nos nervos, não havendo alterações clínicas nem miográficas. Sendo assim, a progressão da doença no receptor é muito mais rápida do que nos pacientes originalmente com PAF.

Por outro lado, o aparecimento desta segunda lista de espera para transplante hepático é benéfico, pois faz diminuir o tempo de espera para os pacientes com doença terminal.

No entanto, o transplante não consegue resolver todos os casos de PAF, pois a TTR também é produzida na retina e no plexus coróide, e mesmo sendo em pequenas quantidades, a sua produção leva à formação de amilóide no olho e no sistema nervoso central. E por outro lado, os indivíduos com PAF que não manifestam os sintomas, não podem realizar o transplante.

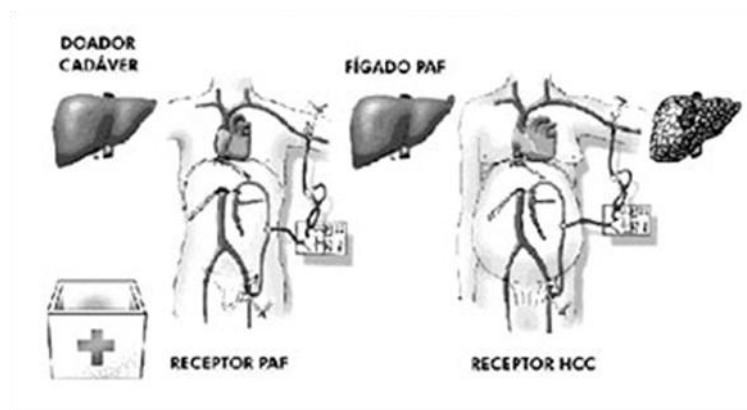


Figura I- 16 – Esquema de transplante sequencial (ou em dominó)
http://www.doencasdofigado.com.br/transplante_figado_02.html.
 (HCC-hepatocarcinoma)

Existem várias investigações em curso com o objectivo de encontrar uma terapia não invasiva e que permita a eliminação permanente e sistémica dos sintomas, de forma a substituir o transplante; quer por redução da TTR mutada do plasma (1), por diminuição dos níveis de mRNA da TTR (2), por substituição do gene mutado (terapia génica) (3), por estabilização da estrutura tetramérica da proteína (4), por prevenção da formação de estruturas amilóides de TTR (5), quer por dissolução das fibras amilóides (6).

A primeira estratégia já foi abordada de duas formas: plasmaferese (Continho, et al., 1988; Ikegawa, et al., 1988) ou por coluna de afinidade com anticorpos monoclonais (Regnault, et al., 1992; Costa, et al., 1998; Tokuda, et al., 1998). Ambas as maneiras produziram resultados positivos como a diminuição de alguns sintomas (diarreia e perda de peso). No entanto, surgiram resultados pouco satisfatórios, possivelmente devido ao rápido *turnover* da TTR no plasma (tempo de meia vida de dois dias) (Jouquan, et al., 1983; Dickson, et al., 1982; Ando, et al., 1995), facto que levou ao estabelecimento dos níveis de TTR anteriores ao tratamento.

A segunda estratégia surgiu como consequência de um tratamento já utilizado para contrariar as hipoproteinémias e hipoalbuminémias associadas à PAF. Verificou-se que a injeção de plasma (*fresh-frozen plasma* - FFP) aumentava os níveis de proteína total e de albumina no sangue, mas também fazia com que aumentassem os níveis de TTR total e diminuíssem os de TTR mutada (Ando, et al., 1995). De seguida verificou-se que injectando TTR wt humana em ratos com PAF ATTR V30M, a expressão do mRNA da TTR diminuía, e ao injectar-se a TTR wt em pacientes com PAF, também ocorria uma diminuição dos níveis da variante no plasma, em 24h-48h após a injeção. No entanto, a redução dos níveis de TTR não

5. Tratamento: passado, presente e futuro

foi suficiente e, mais uma vez devido ao *turnover* desta proteína, esta terapia não pode ser aplicada como terapia única.

A terapia genética já é de certa forma abrangida pelo transplante hepático, mas o objectivo agora é encontrar uma forma não tão invasiva como essa. Assim, já foi considerada a utilização de ribozimas e de métodos *antisense*. Nalguns estudos concluiu-se que a ribozima inosina (15,1)-*hammerhead*, conseguia clivar os mRNA da TTR V30M e da TTR wt e assim diminuir a expressão das duas proteínas (Propsting, et al., 1999). Porém, esta terapia não consegue contornar o facto do turnover da TTR ser rápido, pois não atinge uma supressão total do mRNA.

Uma das terapias genéticas também a considerar é a de quimeroplastia (*chimeraplasty*), que se baseia na utilização de oligonucleótidos quiméricos de DNA e RNA (*chimeraplasts*), para promover uma correcção pontual na sequência de DNA num local específico, neste caso inverter a mutação associada à variante da TTR (Kren, et al., 1997; Xiang, et al., 1997; Kren, et al., 1998; Alexeev, et al., 1998; Kren, et al., 1999). Esta terapia permitiria uma correcção permanente e segura, o que seria ideal. Outra alternativa que mostrou ser até mais eficaz foi a utilização de oligonucleótidos de uma cadeia (*Single-Stranded Oligonucleotides* - SSO) (Gamper, et al., 2000 a; Gamper, et al., 2000 b). Mas da mesma forma como as estratégias anteriores a conversão não foi completa, pelo que é necessária a realização de mais estudos.

Em relação à estabilização do tetrâmero, sabe-se que existem mutações na TTR que a tornam mais estável, estando associadas a muito poucos sintomas, são os casos das variantes Thr119Met e da Arg104His. Os estudos em indivíduos homozigóticos ou heterozigóticos destas variantes mostraram que a estabilização do tetrâmero pode constituir uma via para uma estratégia terapêutica (Alves, et al., 1993; Terazaki, et al., 1999). Foi demonstrado também que o ligando da TTR, a tiroxina, também aumenta a sua estabilidade quando se liga. Assim procurou-se testar alguns fármacos análogos de TTR, como por exemplo anti-inflamatórios não esteróides (NSAID – *non-steroidal anti-inflammatory drugs*) como o ácido flufenamico, que têm estrutura semelhante e ligam-se à TTR no mesmo local que a tiroxina (Baures, et al., 1999).

Estudos recentes sugerem que certos iões metálicos afectam a amiloidogénese, tais como o Cr^{3+} e o Al^{3+} . Verificou-se que o primeiro aumentou a estabilidade do tetrâmero composto por TTR wt e pela variante V30M e suprimiu a amiloidogénese, pelo contrário, o segundo diminuiu a estabilidade e induziu a amiloidogénese (Transthyretin amyloidogenesis altered by Cr^{3+} and Al^{3+} , 2002).

Considerando a vertente preventiva da formação das estruturas amilóides de TTR, foram realizados vários estudos com o BSB¹⁷, que é um derivado do corante *congo red*, que é também utilizado na detecção das fibras amilóides. Outro fármaco estudado foi o 4'-iodo-4'-deoxydoxorubicina (IDOX). Este também se liga às fibras amilóides, mas tem um efeito dissociativo nestas. Também se verificou que o IDOX não produzia o mesmo efeito na TTR wt, tendo sido justificado pelos autores que apenas a variante tinha estrutura adequada para a ligação do fármaco. Ambos os fármacos podem ter efeitos tóxicos no organismo, pelo que são necessários mais estudos (Sebastiao, et al., 2000).

Recentemente foi proposto um novo fármaco, Fx-1006A ou Tafamidis, que funciona como estabilizador selectivo da TTR wt e das variantes, sendo um NSAID à semelhança do ácido

¹⁷ (trans, trans) -1-bromo-2,5-bis- (3-hidroxycarbonil-4-hidroxi) esterilbenzeno

flufenamico. Nos ensaios clínicos realizados até ao ano passado mostrou o impedimento da progressão da doença (*in Data presented demonstrate that tafamidis significantly halts or slows disease progression and reduces burden of disease in patients with TTR amyloid polyneuropathy, 2010*).

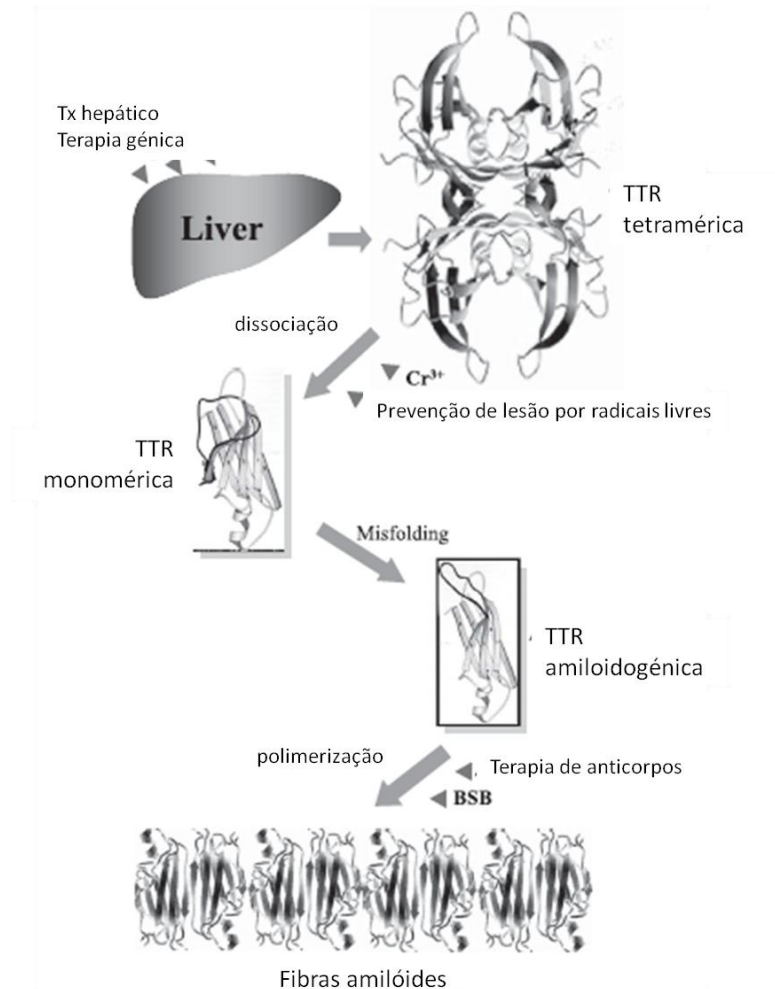


Figura I-17 – Estratégias de tratamento da PAF baseadas na hipótese de amiloidogénese de destabilização do tetrâmero.

II. Materiais e Métodos

II. Materiais e Métodos

1. Recolha e armazenamento da saliva total

A saliva total utilizada nas experiências deste trabalho foi recolhida por volta das 11 horas (antes da segunda refeição) a partir de indivíduos do sexo masculino com Polineuropatia Amiloidótica Familiar (PAF) (n=5) e indivíduos controlo (n=5) com idades compreendidas entre os 24-52 anos. Foram ainda recolhidas amostras de indivíduos transplantados com fígado PAF (transplante sequencial) (n=4) ou fígado de cadáver (n=3) com idades compreendidas entre 59-63 anos e 31-42 anos. Foram recolhidos aproximadamente 5 ml de saliva total por cada indivíduo, após três sequências de enxaguamento da cavidade oral.

As amostras de saliva total foram centrifugadas a 10.000 rpm, durante 10 minutos, a 4 °C, numa centrífuga *Eppendorf* 580R, para remoção de matéria particulada. Os sobrenadantes foram homogeneizados e de seguida as amostras foram armazenadas na forma de aliquotas de 500 µl, a -80 °C.

Todos os passos foram efectuados a 4 °C (em gelo) de forma a conservar o conteúdo proteico, diminuindo a sua degradação por parte dos proteases.

2. Quantificação de proteína total na saliva total

As amostras de saliva total foram submetidas ao método de Bradford para quantificação das proteínas totais presentes.

O método de Bradford é baseado na interacção entre o corante G-250 e a cadeia lateral básica ou aromática dos aminoácidos. Esta interacção promove a estabilização da forma aniónica do corante, que passa a absorver a um comprimento de onda de 595 nm (Bio-Rad).

Para o cálculo da concentração de proteína total é primeiro necessário fazer uma recta de calibração, com medidas das absorvências de várias soluções com concentrações de proteínas diferentes e conhecidas, neste caso, utilizou-se albumina sérica de bovino (*bovine serum albumin* - BSA) (Bio-Rad).

Em primeiro lugar, o reagente corante (Bio-Rad Protein Assay: azul coomassie G-250, ácido fosfórico e metanol) foi diluído 1:5, depois foi adicionado a 2% de amostra de saliva total. Ao fim de 15 minutos foi medida a absorvência da solução a 595 nm, contra o branco de reagente, num espectrofotómetro Beckman DU 7400.

3. Electroforese unidimensional – SDS-PAGE

De forma a separar as proteínas da saliva total, para depois identificá-las, recorreu-se à *sodium dodecyl-sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE).

3. Electroforese unidimensional

Esta técnica baseia-se nas propriedades anfotéricas das proteínas e numa separação proteica por massa molecular.

Na electroforese as proteínas são colocadas num suporte sólido de poliacrilamida e a um pH fixo (8,6) que lhes confere uma carga global dependente do seu ponto isoeléctrico (pI) e são sujeitas a um campo eléctrico. A sua mobilidade (do cátodo para o ânodo) vai depender primeiramente da sua carga e do seu tamanho, pelo que, uma migração de acordo com a sua massa molecular, implica que todas as proteínas tenham uma razão densidade de carga/massa semelhante. Isto é conseguido pela adição de desnaturantes como o β -mercaptoetanol (reduz as proteínas) e do detergente SDS (liga-se na razão de 1 SDS:2 aminoácidos) à amostra, o que vai conferir uma carga global negativa às proteínas nela contidas. O facto de as proteínas estarem desnaturadas também impede que estas migrem segundo a sua conformação nativa (estrutura quaternária).

A eficiência da separação proteica relaciona-se com o tamanho dos poros da “rede” de poliacrilamida, isto é, quanto maior a concentração de poliacrilamida, menor o tamanho dos poros, havendo uma separação melhor para as proteínas de massa molecular menor, e vice-versa.

Nesta técnica é feita uma montagem com dois tipos de gel: um gel de concentração e um de resolução. O primeiro, com uma concentração de 4% de acrilamida, por exemplo, situa-se por cima do gel de resolução e serve para homogeneizar a frente electroforética, ou seja, de forma que as proteínas com maior massa molecular e também as de menor massa molecular migrem ao mesmo tempo. O segundo gel tem uma concentração maior (no caso deste trabalho, 12 %) para a separação efectiva das proteínas da amostra (Bienvenut, 2005).

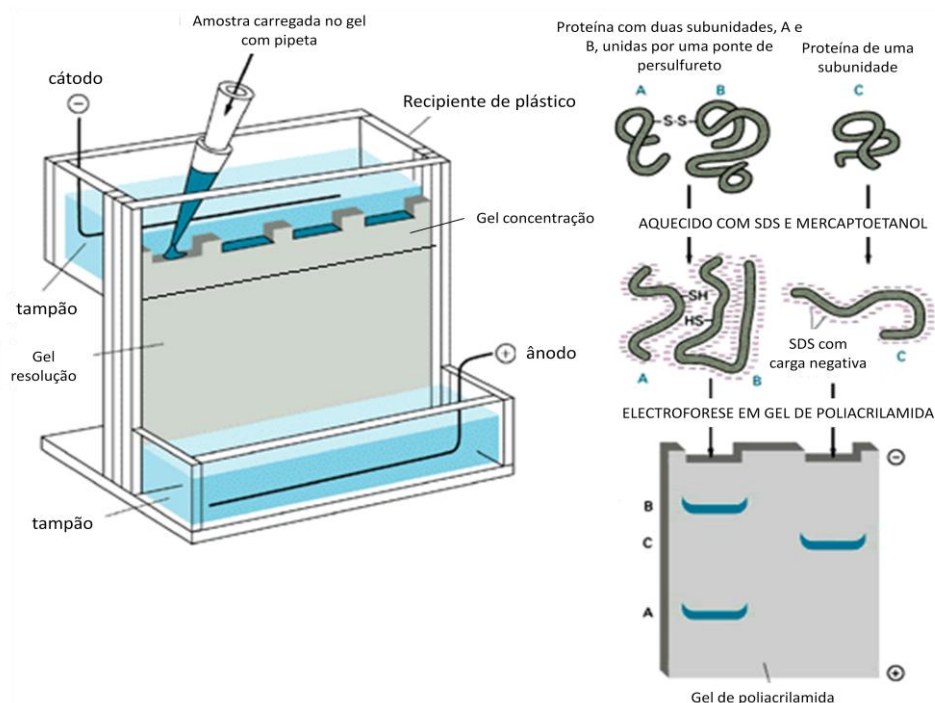


Figura II-18 –Representação esquemática de uma montagem para uma corrida electroforética e do processo de separação das proteínas com o SDS e o β -mercaptoetanol. (adaptado de [http://www.imbjena.de/~rake/Bioinformatics WEB/proteins_purification.html](http://www.imbjena.de/~rake/Bioinformatics_WEB/proteins_purification.html))

De modo a visualizar as bandas das proteínas são utilizados corantes que interagem com os resíduos básicos dos polipéptidos, como é exemplo o azul coomassie.

Para aumentar a sensibilidade da coloração podem ser usadas também colorações de prata, que têm como base a interacção dos iões de prata com os grupos carboxilo das proteínas.

3.1. Géis de poliacrilamida

Todos os géis realizados tinham as dimensões de 7x7 cm e eram compostos por um gel de resolução de 12% e um gel de concentração de 4 %. A composição dos tampões utilizados para a realização dos géis de resolução e concentração encontram-se no Anexo 1.1.

3.2. Preparação e aplicação da amostra

Antes de serem aplicadas no gel, as proteínas das amostras de saliva total foram previamente concentradas/precipitadas com 1 ml acetona (Fluka) durante a noite, tendo sido conservadas a -20 °C durante este processo. De seguida, as amostras foram centrifugadas (10.000 rpm, 10 minutos, a 4 °C), numa centrífuga *Eppendorf* 580R, de modo a precipitar o conteúdo proteico. Depois de se obter o conteúdo proteico em forma de *pellet*, este foi dissolvido em 20 µl de Sample Buffer (composição no Anexo 1.1.). Esta solução permite reduzir e desnaturar as proteínas da amostra. De forma a promover uma maior desnaturação das proteínas da amostra, estas foram submetidas a um banho de 100 °C, durante 1 minuto. O padrão de massas moleculares utilizado foi o *precision plus protein standard-all blue* (Bio-Rad), com massas moleculares compreendidas entre 250 e 10 kDa.

3.3. Corrida electroforética

A corrida electroforética foi realizada sob uma diferença de potencial de 100-150 V, com um tampão de corrida desnaturante (composição no Anexo 1.1.).

Todo o equipamento utilizado para a realização das electroforeses, como tinas, fonte de voltagem, suportes para os géis, foi adquirido à Bio-Rad.

3.4. Coloração dos géis

Depois da corrida electroforética, os géis foram corados com azul coomassie durante a noite (ou durante fim-de-semana) ou com prata, consoante o grau de sensibilidade desejado. A solução de azul coomassie utilizada continha 0,1% (w/v) de coomassie brilliant blue G-250 (Sigma), 50% de metanol (Merck) e 10% de ácido acético glacial (Fisher scientific).

Para descorar os géis foi utilizada uma solução descorante com 10% de ácido acético, 50 % de metanol e 40% de água destilada.

A coloração com prata foi realizada segundo o Plus-One Silver Staining Kit da GE-Healthcare. Em primeiro lugar procedeu-se à fixação (1-24 horas) do gel, de seguida fez-se a sensibilização do gel (1-24 horas), em terceiro lugar incubou-se o gel em solução de prata, por fim foi efectuada a revelação (composição de todas as soluções no Anexo 1.3.).

4. Electroforese bidimensional

Os géis foram digitalizados com uma resolução de 600 dpi, com recurso ao programa LabScan, no *ImageScanner* da *Amersham Biosciences*.

3.5. Análise por *Phoretix*

A intensidade das bandas dos géis de electroforese 1D foi analisada a partir das imagens digitalizadas e com recurso ao programa *Phoretix* (Totalab).

4. Electroforese bidimensional

O recurso à técnica de electroforese bidimensional, neste trabalho, teve o intuito de aumentar a resolução na separação das proteínas, de forma a permitir posteriormente uma identificação mais exacta.

Esta técnica é uma junção de outras duas técnicas de separação proteica, a focagem isoeléctrica (*isoelectric focusing*-IEF) e a electroforese unidimensional – SDS-PAGE. A primeira dimensão é a de IEF que se baseia nas propriedades anfotéricas e no pI das proteínas. As proteínas são colocadas num gel de poliacrilamida com um gradiente de pH (*strip* ou tira) e sujeitas a um campo eléctrico, onde migram até atingirem o pH correspondente ao seu pI. A migração ocorre devido à existência de dois tipos de grupos tampão derivados de acrilamida (*immobilines*) que podem ser ácidos ou básicos (GE Healthcare, 2004).

A segunda dimensão é um SDS-PAGE, mas difere da técnica descrita no ponto 3 no facto de não existir um gel de concentração anterior ao de resolução, pois as proteínas já se encontram concentradas na tira de IEF.

4.1. Primeira dimensão – Focagem isoeléctrica

Na primeira fase de separação foram utilizadas tiras de gel de poliacrilamida (Immobiline DryStrip – GE Healthcare) de 13 ou 7 cm, com gradiente de pH não linear (NL) entre 3 e 11, ou seja, nos valores de pH na zona neutra o intervalo entre cada valor de pH é maior do que nos restantes de forma a separar com maior eficácia as proteínas com pI compreendido entre esses valores.

4.1.1. Preparação e aplicação da amostra

Em primeiro lugar, as amostras foram precipitadas e centrifugadas como descrito em 3.2. O *pellet* obtido foi dissolvido (durante 2 a 4 horas a 500 rpm) na solução de re-hidratação (composição no Anexo 1.2.). Na focagem isoeléctrica com tiras de 13 cm o *pellet* foi dissolvido com o dobro do volume de solução de re-hidratação (250 µl) utilizado nas tiras de 7 cm (125 µl). As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm, por 5 minutos à temperatura ambiente de forma a eliminar o excesso de *pellet* não dissolvido.

Depois de dissolvida, a amostra foi pipetada e distribuída uniformemente ao longo de um suporte para as tiras.

Estas foram posteriormente colocadas sobre a solução de modo a hidratar o gel da tira uniformemente. Também foi adicionado óleo mineral (*cover fluid* de Amersham Biosciences)

de modo a impedir a desidratação da tira durante a focagem isoelectrica e a otimizar a passagem de corrente.

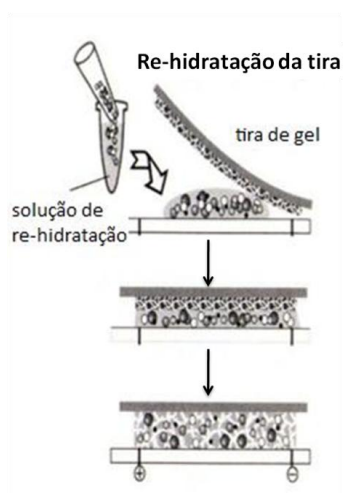


Figura II-19 – Representação esquemática do processo de preparação da amostra e de re-hidratação da tira de gel no “sarcófago” ou suporte para tiras.

O suporte para tiras (“sarcófago”) foi colocado no aparelho de focagem isoelectrica (Ettan IPGphorII – Amersham Biosciences) e a focagem deu-se nas seguintes condições:

Tabela II-2 – Condições de focagem isoelectrica utilizadas no aparelho da Ettan IPGphorII (Amersham Biosciences) para tiras de não lineares com pH entre 3-11 de 7 cm e de 13 cm.

	Strips de 13 cm	Strips de 7 cm
Passo 1:	12 horas a 30 V	12 horas a 30 V
Passo 2:	4 horas a 500 V	150 V/hora até aos 100 V
Passo 3:	gradiente de 1 hora até aos 1000 V	250 V/hora até aos 250 V
Passo 4:	gradiente de 2,5 horas até aos 1000 V	1500 V/hora até aos 1500 V
Passo 5:	4400 V/hora até aos 8000 V	2500 V/hora até aos 2500 V
Passo 6:	-	gradiente de 30 minutos até aos 8000 V
Passo 7:	-	12000 V/hora até aos 8000 V

No final do procedimento as tiras foram guardadas a -20 °C ou utilizadas imediatamente.

4.2. Segunda dimensão – SDS-PAGE

Na segunda dimensão da electroforese bidimensional as proteínas foram separadas por SDS-PAGE num gel de resolução de 12 %, não sendo necessário o gel de concentração.

4.2.1. Preparação das tiras

Antes da corrida electroforética as tiras foram reduzidas e alquiladas. Em primeiro lugar, uma incubação de 15 minutos com a solução de equilíbrio contendo DTT e depois mais 15 minutos com uma solução de equilíbrio contendo iodoacetamida (Sigma), ambas com agitação

5. Western-blotting

(composição das soluções no Anexo 1.2.). Ambas as soluções contêm excesso de SDS o que permite que as proteínas adquiram carga negativa para o SDS-PAGE posterior.

4.2.2. Corrida electroforética

A tira foi colocada por cima do gel e submersa em solução de agarose previamente aquecida (composição no Anexo 1.2.). Esta solução tem o objectivo estabelecer contacto contínuo entre a tira e o gel.

A corrida electroforética foi realizada com uma corrente de 50 mA (para os géis 13x13 cm) por gel ou a 100-150 V (para os géis 7x7 cm), com um tampão de corrida desnaturante concentrado 1x. De forma a evitar o aumento da temperatura durante a electroforese dos géis 13x13 cm foi utilizado um sistema de refrigeração a 10 °C (Figura II-20).



Figura II-20 – Esquema de montagem da segunda dimensão da electroforese bidimensional semelhante ao utilizado, com a fonte de voltagem, o banho refrigerante (GE Healthcare, 2004).

As colorações e descolorações destes géis foram realizadas de acordo com o ponto 3.4., assim como as digitalizações.

4.3. Análise por *SameSpots*

Os géis obtidos foram comparados e analisados no que diz respeito a intensidade e presença/ausência de *spots*, pelo *software SameSpots* (Nonlinear dynamics) e o método de análise estatística *principal components analysis* (PCA – análise dos componentes principais), com a colaboração do Dr. Ricardo Gomes do Instituto de Tecnologia Química e Biológica (ITQB).

5. Western blotting

O *western blotting* é uma técnica muito utilizada para a pesquisa de proteínas ou modificações pós-traducionais após a sua separação em gel. Esta técnica compreende a transferência ou *blotting* das proteínas a partir do gel para uma membrana hidrofóbica, como PVDF (*polyvinylidene difluoride*), e a posterior detecção das proteínas marcadas através de reacções anticorpo/antigénio. O anticorpo primário liga-se às proteínas que se querem pesquisar (antigénio) e o anticorpo secundário, associado a um enzima que permite a

formação de um composto luminoso (neste caso o peroxidase) liga-se ao anticorpo primário (antigénio).

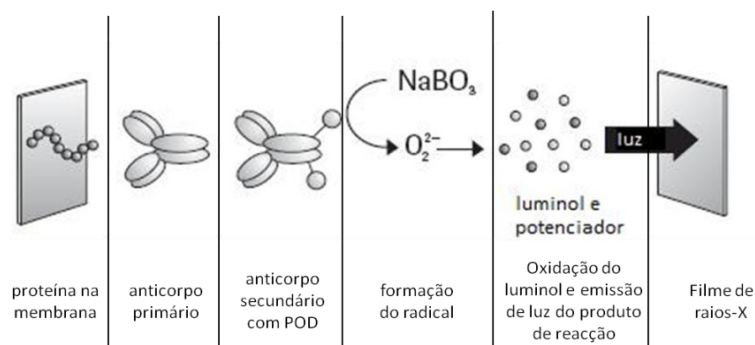


Figura II -21 – Representação esquemática da fase de detecção do western-blotting. (POD – peroxidase) (adaptado de Roche Applied Sciences, 2005)

Após a adição do substrato luminoso e de um potenciador da reacção de oxidação deste, é emitida luz que é fixada num filme de raios-X (Figura II-21) (Roche Applied Sciences, 2005).

5.1. Transferência

Após da separação das proteínas da amostra de saliva total por SDS-PAGE, realizou-se a transferência dessas proteínas para uma membrana hidrofóbica de PVDF (Millipore). A composição do tampão de transferência encontra-se em anexo.

A membrana de PVDF e o gel foram equilibrados em tampão de transferência, sendo que a membrana foi previamente activada com metanol. Os papéis e as esponjas utilizados para fazer pressão e aumentar o contacto entre o gel e a membrana também foram equilibrados no tampão de transferência. Foi feita a montagem/*sandwich* como mostra a Figura II-22, a qual foi colocada num suporte e numa tina, com o tampão de transferência e um bloco de gelo, para a refrigeração.

A transferência foi efectuada com uma diferença de potencial constante de 100 V durante 65 minutos.

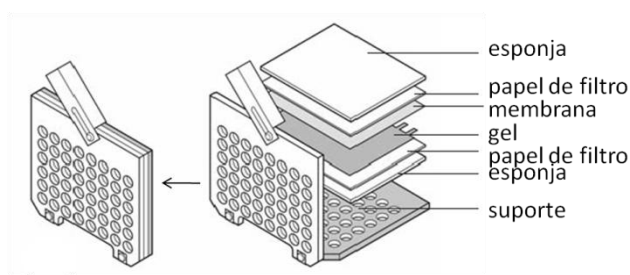


Figura II -22 – Esquema da montagem realizada para a transferência no western-blotting com as esponjas, os papeis de filtro o gel e a membrana. (adaptado Bio-Rad)

De modo a poder verificar se a transferência foi bem sucedida foi utilizado o corante Ponceau S (composição da solução em Anexo 1.4.) para visualizar as bandas transferidas para a membrana. Para remover a coloração foram efectuadas diversas lavagens consecutivas com água destilada ou Tris-Buffered Saline (TBS – composição no Anexo 1.4.) (pH=7,5).

5.2. Bloqueio da membrana

Após a transferência das proteínas do gel para a membrana PVDF, esta foi bloqueada com uma solução de 5% de leite em pó (Nestlé) em TBS-T (composição no Anexo 1.4.), durante a noite, a 4 °C e com agitação, de forma a tornar a reacção imunoquímica, entre os anticorpos e os antigénios (proteínas de interesse), mais específica.

5.3. Incubação da membrana com os anticorpos

5.3.1. Anticorpo primário

Depois de bloqueada a membrana de PVDF foi incubada com o anticorpo primário desejado, durante a noite, a 4 °C e com agitação. Os anticorpos primários utilizados foram: anti-argpirimidina (Imunoglobulina G - IgG) (Sigma); anti-tetra-hidropirimidina (IgG) (Sigma); TTR policlonal (IgG anti-human) (santa Cruz Biotechnology). Este foi sempre diluído numa solução de 1% de leite em pó em TBS-T de acordo com a Tabela II-4.

5.3.2. Anticorpo secundário

De seguida a membrana foi sujeita a 4 lavagens de 10 minutos cada, com TBS, para retirar o excesso de anticorpo que não se ligou a nenhuma proteína.

O anticorpo secundário utilizado foi o de IgG *goat anti-mouse* (Sigma-aldrich) e IgG *rat anti-rabbit*, que também foram diluídos como em solução de 1% de leite em pó (Tabela II-4). A sua incubação foi efectuada durante 3 horas, com agitação, a qual foi seguida de três lavagens com TBS, de 15 minutos cada.

Tabela II-4 – Anticorpos primários e secundários correspondentes, com a diluição em solução de 1% de leite em pó.

Anticorpo primário	Diluição	Anticorpo secundário	Diluição
Anti-argpirimidina	1/1.000	<i>goat anti-mouse</i>	1/5.000
Anti-tetra-hidropirimidina	1/2.000	<i>goat anti-mouse</i>	1/5.000
Anti-human TTR policlonal	1/10.000	<i>rat anti-rabbit</i>	1/10.000

5.4. Revelação

A fase de revelação foi realizada na câmara escura, onde a membrana de PVDF foi coberta por uma solução de detecção constituída por um substrato fluorescente (luminol) e um potenciador (4-iodofenol) (Roche). De seguida, a membrana foi colocada numa cassette (Hypercassette – Amersham Life Sciences), sob a qual foi colocado um filme de revelação raios-X (Kodak) de forma a ser exposto à luz emitida pelas bandas ou *spots* marcados (Figura II-23). Após algum tempo de exposição, que varia consoante a intensidade luminosa das bandas ou *spots*, o filme foi colocado numa solução de revelação (Kodak-GBX), com agitação, até surgirem as bandas ou *spots* marcados pelos anticorpos. De seguida fixou-se (Kodak-GBX) o filme e lavou-se com água corrente.

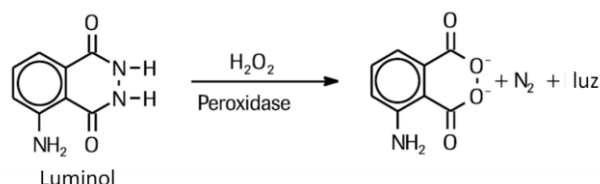


Figura II -23 – Esquema da reacção de formação de luz a partir do luminol, com utilização de peroxidase.
(adaptado de Roche Applied Sciences, 2005)

6. Espectrometria de massa

A espectrometria de massa tem sido uma técnica muito utilizada desde os finais dos anos 80 para a identificação de proteínas, após o desenvolvimento de métodos de ionização mais suaves, como o *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization* (MALDI) e o *Electrospray Ionization* (ESI).

Um instrumento de espectrometria de massa é constituído por uma fonte de iões, um analisador de massa e um detector de iões (Figura II-24). Existem diversos sistemas de ionização, análise e detecção de iões que podem ser utilizados em diversas combinações, podem ainda existir combinações de vários tipos de analisadores de iões.

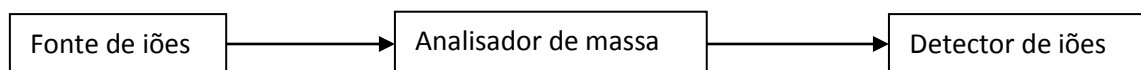


Figura II -24 – Representação esquemática dos componentes mais comuns encontrados num espectrómetro de massa.

A fonte de iões (MALDI e ESI) tem como função ionizar o analito e transferi-lo para a fase gasosa. A ionização é conseguida pela protonação do analito ($[Massa+H]^+$) com recurso a um dador de protões (ex: ácido orgânico). No caso do método de MALDI (Figura II-25 (A)), o analito é co-cristalizado com uma solução de matriz, que facilita a absorção e transferência de energia proveniente do laser, permitindo a vaporização do analito (Schuchardt, et al., 2007). Neste trabalho a solução de matriz utilizada foi uma solução saturada com ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA).

Os analisadores diferem bastante entre si, neste trabalho foram utilizados o *time of flight* (TOF) composto com um segundo TOF (TOF-TOF) e o *fourier transform-ion cyclotron resonance* (FT-ICR). O analisador TOF (Figura II-25 (B)) baseia-se na medição do tempo de voo do ião, a partir do momento em que este é acelerado até ser detectado. A velocidade de voo e, consequentemente, o tempo de voo, variam com a razão massa/carga do ião, isto é, quanto maior for a razão massa/carga, menor será a velocidade e mais demorará o ião a percorrer o tubo de voo. Por outro lado, o analisador FT-ICR (Figura II-25 (C)) mede a frequência do movimento circular dos iões, isto é, a frequência de ciclotrão (que é função da razão massa/carga e da força do campo magnético) provocada por um campo eléctrico estático e um campo magnético estático uniforme (Schuchardt, et al., 2007).

6. Espectrometria de massa

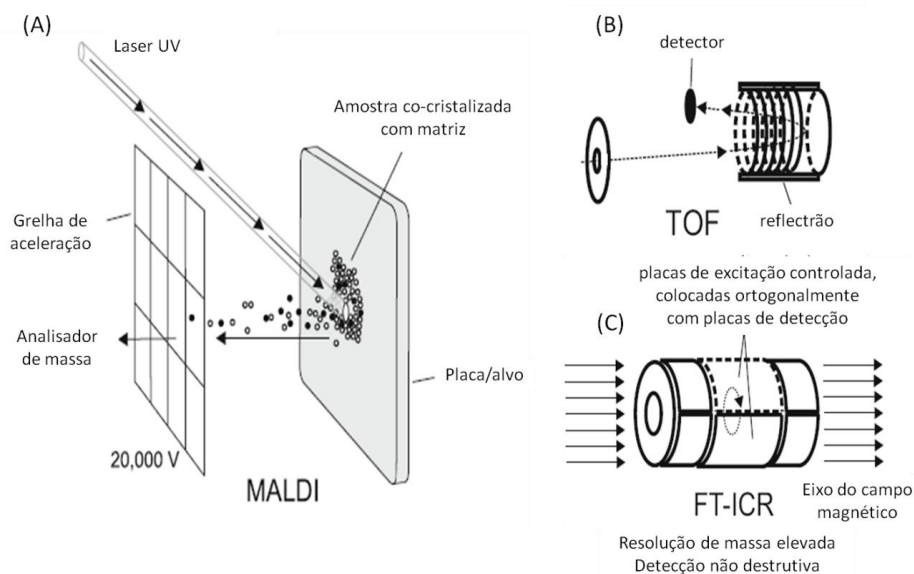


Figura II -25 – Representação esquemática da fonte iónica do tipo MALDI (A) e dois tipos de analisadores de massa: (B) TOF e (C) FT-ICR. (adaptado de Schuchardt, et al., 2007)

Os métodos de análise de proteínas mais comuns consistem num passo de separação destas por electroforese, seguido da conversão das proteínas em péptidos para a obtenção da sua massa específica e identificação da proteína com a sequência correspondente.

O método mais utilizado é o de peptide mass fingerprinting (PMF) (Figura II -26) por ser mais rápido. Este baseia-se na digestão das proteínas com um protease de especificidade elevada para determinados resíduos, como a tripsina (que cliva nos resíduos de lisina e arginina, excepto quando estes estão adjacentes a uma prolina) e no facto dos péptidos produzidos a partir de determinada proteína serem únicos. Isto significa que o conjunto de massas obtidas a partir da análise dos péptidos pode ser comparado com um conjunto de massas calculadas em bases de dados, para a identificação da proteína (Schuchardt, et al., 2007).

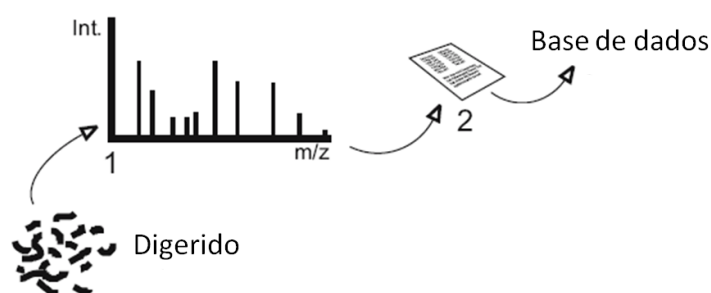


Figura II -26 – Esquema do processo de análise proteica pelo método de PMF. 1. Obtenção dos espectros por espectrometria de massa correspondentes aos péptidos obtidos na digestão, 2. Obtenção de uma lista de picos dos péptidos detectados que depois é comparada a uma base de dados como a Mascot e identificar as proteínas. (adaptado de Schuchardt, et al., 2007)

6.1. Digestão *in gel* das proteínas

De forma a minimizar contaminações das amostras com outras proteínas, foi necessário tomar algumas precauções, como o uso obrigatório de luvas, bata e material estéril.

6.1.1. Excisão

Para a análise por PMF as proteínas foram primeiro digeridas segundo um protocolo que é iniciado pela excisão das bandas ou spots pretendidos a partir dos géis. No caso de serem bandas, estas tiveram que ser cortadas em “cubos” de aproximadamente 1 mm³.

6.1.2. Lavagem

De seguida, as bandas ou spots foram lavados. No caso de terem sido corados com azul de coomassie, começou-se por incubá-las em água milliQ durante 20 minutos, a 37 °C e depois em 50% acetoneitrilo (ACN) (Merck), durante 30 minutos, a 37 °C, repetindo-se este passo até as bandas estarem transparentes. Por último, as bandas ou spots foram “comprimidas ou desidratadas” com 100% de ACN, por 30 minutos, a 37 °C. No caso de as bandas ou spots terem sido corados com prata, aos passos descritos anteriormente antecedeu-se o passo da incubação com *potassium ferricyanide/sodium thiosulfate* 1:1, no escuro. Todas as incubações foram realizadas com agitação.

6.1.3. Redução e alquilação

A redução e alquilação das bandas de gel facilita a acção do protease e apenas são efectuadas para os géis unidimensionais, pois o procedimento dos géis bidimensionais já contém um passo de redução e alquilação das proteínas.

Em primeiro lugar, as proteínas foram reduzidas incubando-se as bandas com 10 mM de DTT (Sigma) em 100 mM de NH₄HCO₃ (Sigma), durante 45 minutos a 56 °C. De seguida as proteínas foram alquiladas, incubando-se as bandas com 55 mM de iodoacetamida (Sigma) em 100 mM de NH₄HCO₃, durante 30 minutos, no escuro.

Depois de reduzidas e alquiladas as bandas foram lavadas com 50% de ACN duas vezes durante 10 minutos para remover o excesso de DDT e iodoacetamida e “comprimidas” de novo, com 100% de ACN. Todas as incubações foram realizadas com agitação de forma a aumentar a eficácia de cada passo em questão.

No final, as bandas foram secas numa centrífuga de vácuo (*Speed Vac Concentrator* – Savant).

6.1.4. Digestão com tripsina

Neste passo as bandas ou spots foram re-hidratados com tampão de digestão composto por 50 mM de NH₄HCO₃ e 6.7 ng/μl de tripsina (Promega), durante 30 minutos. Este passo foi efectuado a 4°C de modo a impedir a auto-protólise do enzima. De seguida, as bandas ou spots foram incubadas em NH₄HCO₃, a 37 °C, durante a noite, para promover a digestão proteica.

No final do procedimento as bandas e a solução de péptidos foram separadas dos pedaços de gel e armazenadas a -20 °C.

6.2. Purificação e aplicação na placa dos péptidos digeridos

Antes da sua colocação na matriz, a mistura de péptidos obtida deve ser purificada e concentrada de forma a remover todos os sais e outros contaminantes que possam estar presentes na amostra. Para isso recorreu-se a uma micro-coluna de cromatografia de fase reversa do tipo C8 (Poros reverse phase R2 - Applied Biosystems).

6.2.1. Preparação da coluna

O protocolo de preparação da coluna passou pela activação da resina com ACN 50 % e equilíbrio da mesma com ácido trifluoroacético (TFA) (Sigma) 0,1 %, solução na qual a resina é conservada.

6.2.2. Purificação e concentração dos péptidos

O protocolo de purificação compreende a eluição do TFA, seguida da aplicação e eluição da amostra e nova lavagem com TFA 0,1%. De seguida é aplicada a solução de matriz (10 µg/µL de CHCA¹⁸ (Sigma) em 50% ACN com 0,1% TFA) e os péptidos são eluídos directamente para a placa de MALDI AnchorChip (Bruker Daltonics, Bremen).

6.3. Obtenção dos espectros e das massas

A mistura de péptidos foi analisada através de MALDI-FT-ICR-MS num espectrómetro de massa Bruker Apex Ultra, Apollo II combi-source (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), com um íman de 7 Tesla (MagneX corporation, Oxford UK) e em colaboração com o ITQB num MALDI-TOF-TOF (Applied Biosystems) com a colaboração com Dr. Ricardo Gomes.

As massas dos picos monoisotópicos dos péptidos foram determinadas pelo programa *Data Analysis* versão 3.4, através do algoritmo SNAP 2 (Bruker Daltonics). Estas foram depois submetidas ao programa de identificação de proteínas Mascot (Matrix Science, Londres, Reino Unido; <http://www.matrixscience.com>) e analisadas com o programa *Biotoools* 3.1 (Bruker Daltonics).

6.4. Identificação das proteínas por PMF

Para a comparação das massas dos péptidos e identificação das proteínas correspondentes utilizaram-se bases de dados como MSDB (base de dados de sequências proteicas não idênticas, do Departamento de Proteómica do Campus Hammersmith, Imperial College, Londres; <http://csc-fserve.hh.med.ic.ac.uk/msdb.html>) e UniProtKB/SwissProt (base de dados de sequências não-redundantes de proteínas, ExPasy; <http://www.uniprot.org>). Foi considerada um erro máximo de 10 ppm.

¹⁸ alpha-Cyano-4-hydroxycinnamic acid – ácido α-ciano-4-hidroxicinamico

III. Resultados

III. Resultados

1. Quantificação de proteína total

Neste trabalho, a concentração total de proteína na saliva foi quantificada segundo o método de Bradford¹⁹, sendo utilizada uma recta de calibração de albumina do soro de bovino (BSA) (Figura III-7), com a seguinte equação (Equação III-1). Observou-se uma menor concentração de proteína total na saliva nos indivíduos com PAF.

$$C(\mu\text{g} / \mu\text{l}) = 1.013 \cdot \text{abs}_{595\text{nm}} - 0.136 \quad \text{Equação III-1}$$

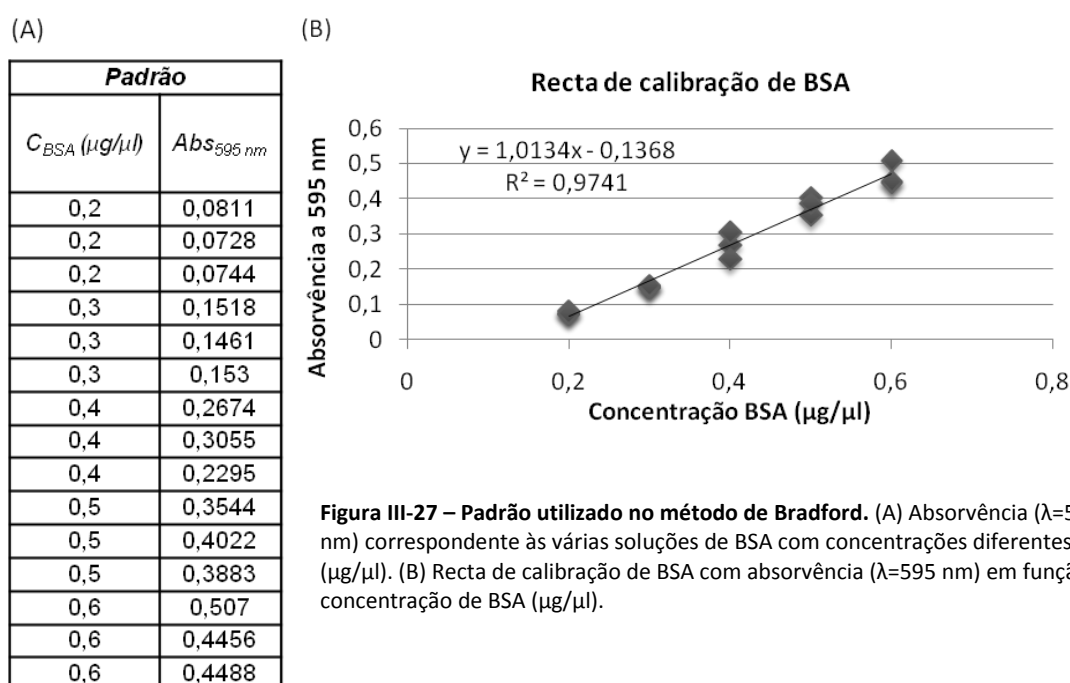


Figura III-27 – Padrão utilizado no método de Bradford. (A) Absorvência ($\lambda=595$ nm) correspondente às várias soluções de BSA com concentrações diferentes ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$). (B) Recta de calibração de BSA com absorvência ($\lambda=595$ nm) em função da concentração de BSA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

No entanto, após uma análise estatística (T-student) as quantidades de proteína total na saliva de indivíduos controlo e de indivíduos com PAF não foram consideradas significativamente diferentes (Figura III-28).

Concentração média de proteína total ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

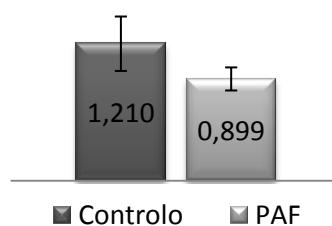


Figura III-28 – Concentração média de proteína total da saliva total de indivíduos controlo e com PAF.
 $p=0.23 (>0.01)$.

¹⁹ concentração de proteína total das várias amostras no Anexo 2.

2. Perfis electroforéticos de saliva total de indivíduos com PAF e indivíduos controle.

As glândulas salivares de indivíduos com PAF encontram-se infiltradas por fibras amilóides (LECHAPT-ZALCMAN, et al., 1999), o que pode levar a alterações do seu funcionamento. Estas alterações funcionais foram estudadas neste trabalho ao nível do proteoma da saliva total.

Como primeira abordagem a este estudo foram realizados SDS-PAGE para a análise dos seus perfis electroforéticos.

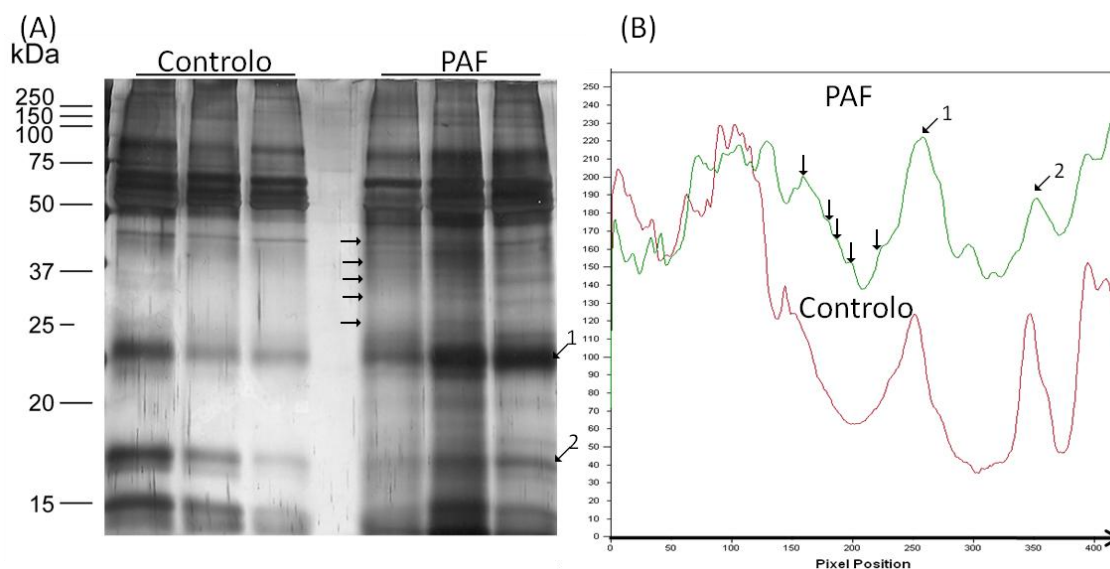


Figura III-29 – Perfil electroforético diferencial da saliva total de indivíduos controle e com PAF. (A) SDS-PAGE 12% de saliva total de indivíduos controle e com PAF corado com prata. (B) Perfil electroforético do gel mostrado em (A) de um indivíduo PAF e de um indivíduo controle com intensidade das bandas em função da sua posição. As diferenças estão assinaladas com ✓ e as semelhanças com 1 e 2.

Na Figura III-29 são claras as diferenças entre o perfil electroforético da saliva dos indivíduos com PAF e na saliva dos indivíduos controle. Em primeiro lugar, observa-se um maior número de bandas no perfil electroforético dos indivíduos PAF (assinalado com ✓).

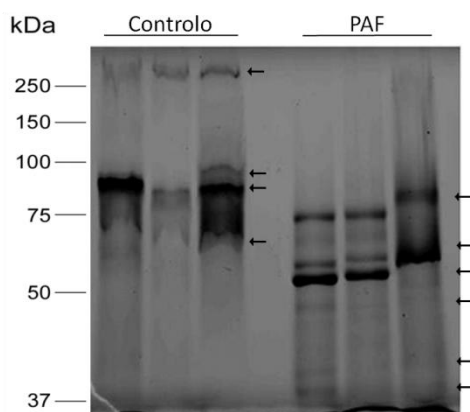


Figura III-30- Perfil electroforético com percentagem de acrilamida menor que 12% da saliva total de indivíduos controle e com PAF (diferenças assinaladas com ✓).

Com uma percentagem de acrilamida menor que 12% é possível observar algumas diferenças com mais pormenor (Figura III-30). Para além de se observar, novamente, um maior número de bandas na saliva de indivíduos com PAF, também se observa uma maior mobilidade electroforética destas.

Estas observações podem estar associadas a uma expressão proteica diferencial, a degradação proteica ou a modificações pós-traducionais. De modo a investigar com mais atenção esta observação foi utilizada a técnica de electroforese bidimensional.

3. Identificação das proteínas presentes na saliva total de indivíduos PAF e de indivíduos controlo separadas por SDS-PAGE.

Visto terem-se verificado algumas diferenças nos perfis electroforéticos dos indivíduos PAF, foi necessário identificar as proteínas que poderiam estar diferenciadamente expressas, ou degradadas, ou modificadas pós-traducionalmente na saliva total destes indivíduos. Para isso recorreu-se à espectrometria de massa.

Tabela III-4 – Proteínas identificadas por PMF a partir de SDS-PAGE de saliva total de indivíduos controlo e com PAF (tabela completa no Anexo 3).

Proteínas identificadas na saliva controlo	Proteínas identificadas na saliva PAF
α -sinucleína	mucina-5B
mucina-5B	α -amilase 2B
α -amilase 2B	α -amilase 1
α -amilase 1	cistatina-SN
cistatina-SN	receptor poli-Ig
receptor poli-Ig	albumina sérica
albumina sérica	cadeia C - Ig α -1
cadeia C - Ig α -1	cadeia C - Ig α -2
cadeia C - Ig α -2	α -amylase pancreática
α -amilase pancreática	cadeia C - Ig κ
actina, citoplásmica 2	cistatina-S
actina, α músculo cardíaco 1	lisozima C
actina, α músculo esquelético	aglutinina salivar
actina, citoplasmática 1	glutathione S-transferase P
calgranulina-A	proteína antagonista do receptor de interleucina-1
glicoproteína zinco-alpha-2	proteína de ligação a ácidos gordos, epidermal
anidrase carbónica 6 salivar	cadeia pesada V-III - Ig BRO
cadeia C - Ig κ	Ubiquitina
zimogénio de proteína granular 16 homólogo B	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
proteína básica salivar rica em prolinas 2	defensin 3 – neutrófilo
lipocalina-1	cistatina-B
proteína indutível por prolactina	
proteína UPF0635 (C6orf134)	
cistatina-S	
cistatina-SA	
lisozima C	
subunidade α – hemoglobina	
calgranulina-B	

3. Identificação das proteínas presentes na saliva total de indivíduos PAF e indivíduos controlo separadas por SDS-PAGE

Este método permitiu a realização de 56 identificações, correspondendo a 28 proteínas diferentes na saliva controlo e de 122 identificações, correspondendo a 21 proteínas diferentes na saliva dos doentes (Tabela III-4 e Anexo 3).

As massas moleculares das proteínas identificadas foram calculadas através de uma recta de calibração com r_f (distância de migração relativa) em função de $\log MM$ (massa molecular), a partir do padrão de massas moleculares.

Entre as proteínas identificadas em indivíduos com PAF algumas encontravam-se acima da sua massa molecular (Tabela III-5 e Anexo 3), indicando a presença de modificações pós-traducionais ou agregação.

Tabela III-5 – Proteínas identificadas a partir dos géis 1D acima da sua massa molecular.

Nome da proteína	MM aparente	MM teórica	Nome da proteína	MM aparente	MM teórica
α -sinucleína	178,60	14,46	α -amilase 1	204,65	57,77
mucina-5B		590,50	α -amilase 2B		57,71
α -amilase 2B		57,71	aglutinina salivar		260,74
α -amilase 1		57,77	mucina-5B		590,50
cistatina-SN		16,36	α -amilase 2B	158,74	57,71
α -sinucleína	143,06	14,46	α -amilase pancreática		57,71
α -amilase 2B		57,71	receptor poli-Ig	103,40	83,28
α -sinucleína	124,85	14,46	α -amilase 2B		57,71
receptor poli-Ig	107,04	83,28	α -amilase 1		57,77
α -amilase 2B		57,71	α -amilase pancreática		57,71
receptor poli-Ig	91,12	83,28	receptor poli-Ig	77,57	83,28
α -amilase 2B		57,71	α -amilase 2B		57,71
α -sinucleína	67,70	14,46	α -amilase 1		57,77
albumina sérica	64,98	69,37	albumina sérica	70,68	69,37
α -sinucleína		14,46	cistatina-S		16,21
albumina sérica	56,07	69,37	região da cadeia C da Ig α -2	62,48	36,53
região da cadeia C da Ig α -1		37,66	região da cadeia C da Ig α -1		37,66
região da cadeia C da Ig α -2		36,53	albumina sérica		69,37
α -amilase 2B		57,71	cistatina-SN		16,36
α -amilase 1		57,77	α -amilase 2B		57,71
α -amilase 1	50,91	57,77	α -amilase 2B		57,71
α -amilase 2B		57,71	α -amilase 1	52,51	57,77
α -amilase pancreática		57,71	albumina sérica		69,37
α -amilase 1	46,67	57,77	região da cadeia C da Ig α -1		37,66
α -amilase 2B		57,71	α -amilase 1	49,41	57,77
região da cadeia C da Ig α -1	43,12	37,66	α -amilase 2B		57,71
albumina sérica		69,37	albumina sérica		69,37
α -amilase 2B		57,71	albumina sérica	45,42	69,37
α -amilase pancreática		57,71	α -amilase 2B		57,71

Neste estudo foi possível a identificação de proteínas que não tenham sido ainda encontradas no proteoma da saliva total humana (<http://www.skb.ucla.edu/cgi-bin/hspmscgi->

[bin/search_pro_c.cgi](#) e <http://www.salivarium.ucsf.edu/submit?page=ProteinList>). Estas proteínas foram: a α -sinucleína, a proteína UPF0635 C6orf134 e o zimogénio granular 16 (homólogo B). Dentro destas três, apenas foi possível confirmar a presença da α -sinucleína na saliva por western-blot, uma vez que era a única para a qual disponhamos anticorpo (atenciosamente pelo Dr. Tiago Outeiro, IMM²⁰) (Figura III-31). Tal como nas identificações efectuadas a partir do gel 1D, esta proteína encontra-se muito acima do seu massa molecular no *western-blot*, na saliva de indivíduos controlo e de indivíduos PAF, apesar de esta não ter sido identificada por PMF na saliva indivíduos PAF. Para além disso, no perfil electroforético da saliva de indivíduos PAF a proteína está mais distribuída ao longo desse perfil.

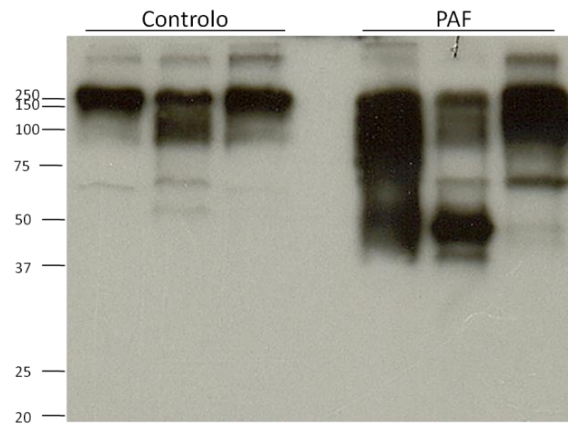


Figura III-31 – Pesquisa de α -sinucleína na saliva total humana. *Western-blot* com marcação para a α -sinucleína de saliva total de indivíduos controlo e com PAF.

²⁰ Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa.

4. Identificação de proteínas diferenciadamente expressas em indivíduos PAF e indivíduos controlo

4. Identificação de proteínas diferenciadamente expressas em indivíduos PAF e indivíduos controlo.

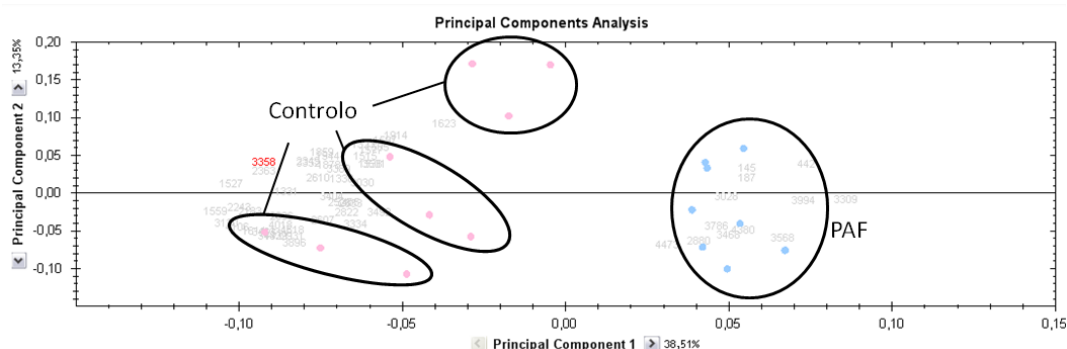
Nas experiências de SDS-PAGE foi possível observar algumas diferenças entre o perfil proteico da saliva de indivíduos controlo e da saliva de indivíduos PAF. Partindo destes resultados foram realizados géis com maior resolução, como é o caso da electroforese bidimensional, para um estudo mais completo de cada proteína que possa estar diferenciadamente expressa ou modificada, nomeadamente para a sua posterior identificação.

4.1. Análise por *Samespots*[®] e pesquisa de proteínas com expressão diferencial

A análise dos géis bidimensionais foi realizada através do programa *Samespots*[®] (Nonlinear Dynamics Limited) que selecciona os *spots* do gel e os alinha com os spots correspondentes dos géis correspondentes a diferentes amostras. A análise estatística do volume dos spots permite identificar proteínas que poderão estar diferenciadamente expressas na saliva de indivíduos PAF. Para tal foi necessária a realização de 3 replicados biológicos e de triplicados experimentais, ou seja, um conjunto de 9 géis para cada grupo (com a colaboração do Dr. Ricardo Gomes, ITQB²¹).

De forma a rever os spots seleccionados pelo programa realizou-se uma análise estatística dos componentes principais (principal components analysis – PCA). Esta determina os eixos principais da variação de expressão entre os dois grupos de géis, a partir dos níveis de expressão dos spots, permitindo a separação das amostras de acordo com a variação da expressão, sendo útil para a identificação de *outliers*, neste caso géis que se encontram desviados no seu grupo.

Nas análises de PCA, cada ponto representa um gel, sendo que não foi contabilizado um gel de PAF, por ter sido considerado muito diferente dos restantes (*outlier*).



Foi possível observar claramente uma separação entre os géis pertencentes aos indivíduos PAF e os pertencentes aos indivíduos controlo. Por outro lado, os géis controlo estão mais dispersos entre si, com 3 grupos de 3 pontos. Cada um destes grupos corresponde a um indivíduo. As amostras dos indivíduos PAF foram recolhidas em ambiente hospitalar, mais controlado e a tempos mais exactos. Esses indivíduos estão mais acompanhados do ponto de vista clínico e seguem dietas muito rigorosas. As amostras dos indivíduos controlo foram recolhidas entre os elementos do laboratório, como tal, todo o controlo e dieta dos indivíduos é menos homogénea. Este facto pode explicar a maior homogeneidade obtida para os indivíduos PAF do que para os indivíduos controlo. Nos indivíduos controlo existe claramente uma separação entre cada indivíduo o que denota um menor controlo na recolha das amostras.

Finalmente, esta análise permitiu encontrar de 51 spots com diferentes intensidades entre as amostras PAF e controlo (Figura III-33). É possível observar na Figura III-34 alguns exemplos dessas proteínas diferenciadamente expressas.

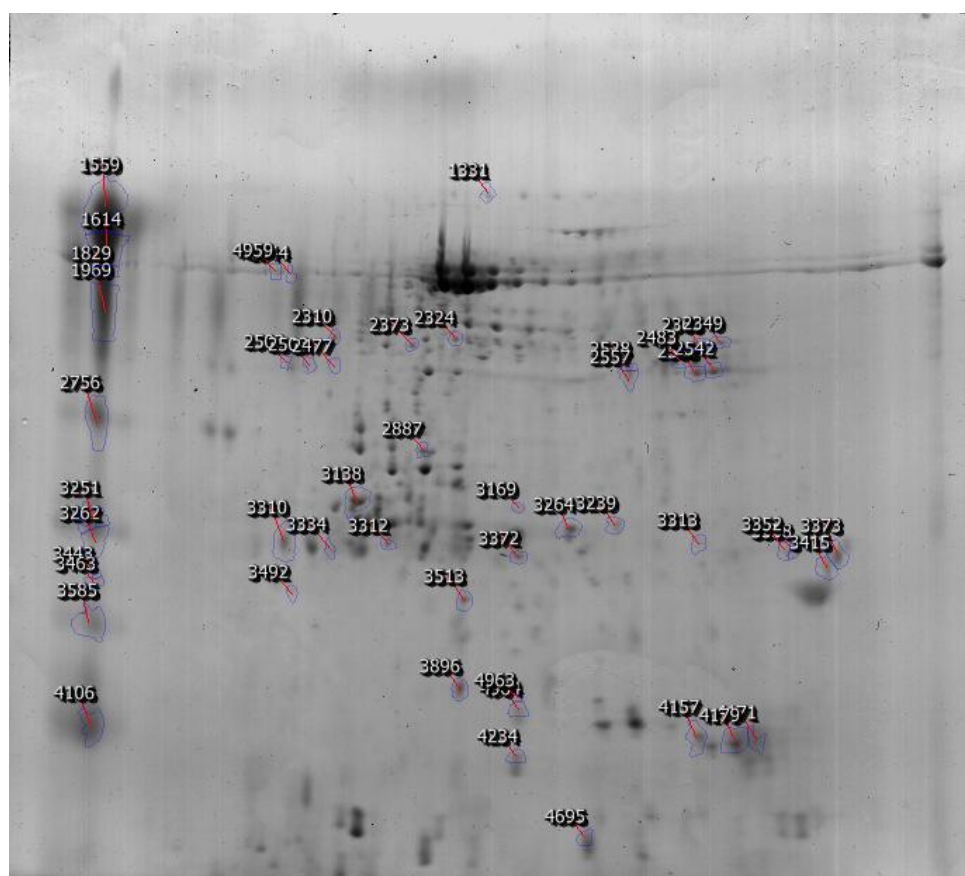
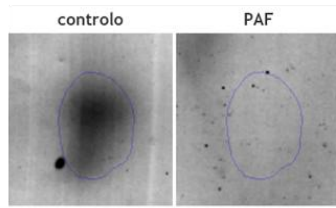


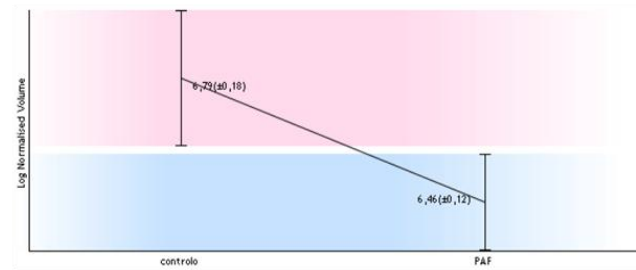
Figura III-33 – Gel de electroforese bidimensional controlo com spots assinalados depois de análise por Samespots. Os números correspondem aos spots diferentes determinados pelo programa Samespots com a análise de todos os géis excepto 1 controlo (3 géis).

4. Identificação de proteínas diferenciadamente expressas em indivíduos PAF e indivíduos controle

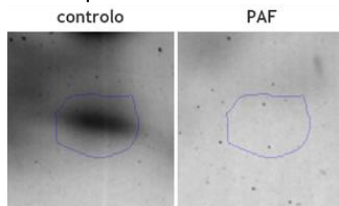
(A) 3896 - α -amilase 1, α -amilase 2B



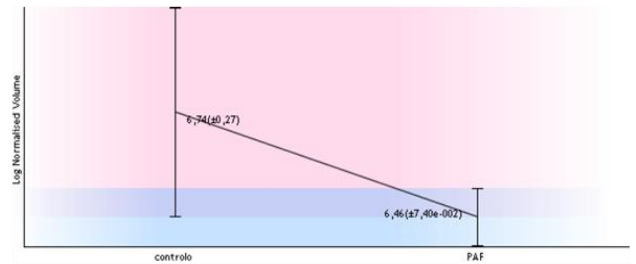
(B) $p < 0.05$; $f > 1.5$



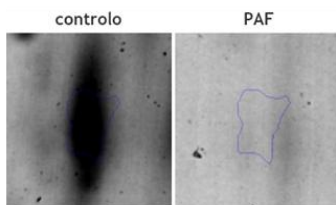
(C) 3372 - α -amilase 2B, α -amilase 1, α -amilase pancreática



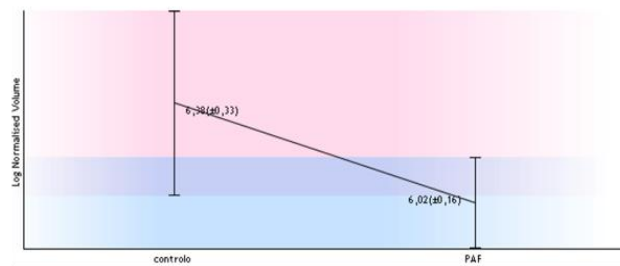
(D) $p < 0.05$; $f > 1.5$



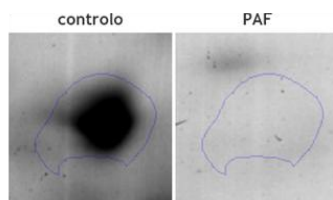
(E) 2502 - receptor poli-Ig, α -amilase 2B



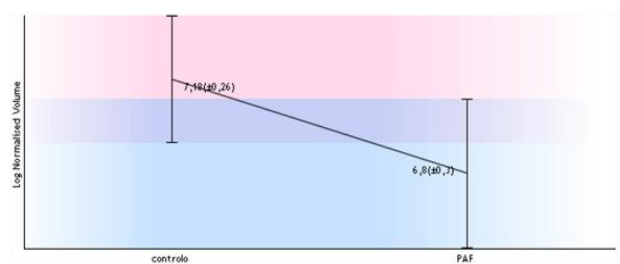
(F) $p < 0.05$; $f > 1.5$



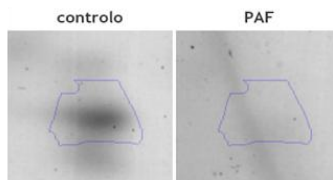
(G) 3264 - queratina, tipo II citosquelal 1



(H) $p < 0.05$; $f > 1.5$



(I) 4964 - α -amilase 2B, α -amilase pancreática



(J) $p < 0.05$; $f > 1.5$

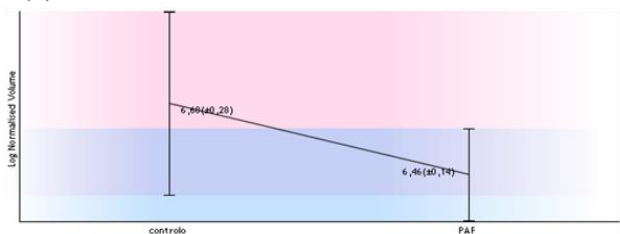


Figura III-34 – Spots controle e PAF com volumes diferentes. (A), (C), (E), (G) e (I): spots selecionados; (B), (D), (F), (H) e (J): gráficos correspondentes aos volumes diferenciais de cada spot controle ou PAF.

4.2. Identificação das proteínas diferenciadamente expressas

Para determinar quais as proteínas correspondentes a cada *spot* e que estarão com expressão diferencial na saliva de indivíduos com PAF foi utilizado mais uma vez a espectrometria de massa (com a Colaboração do Doutor Ricardo Gomes – ITQB). Neste caso, foram identificados apenas os *spots* de um dos géis controlo, assumindo que nos géis de PAF as proteínas que estivessem na mesma posição corresponderiam a proteínas iguais às identificadas no controlo.

Através desta técnica foi possível a identificação de um total de 93 proteínas com uma expressão diferencial, correspondendo a 27 proteínas únicas (Tabela III-6 ou Figura III-35 ou Anexo 5).

As proteínas com maior número de identificações (mais de 3 identificações) foram (Figura III-35): cadeia C-Ig α -2, cadeia C- Ig α -1, albumina sérica, glicoproteína zinco α -2, α -amilase 1, α -amilase 2B, receptor polimérico de Ig e actina citoplasmática 1 e 2. O facto de serem realizadas várias identificações correspondentes à mesma proteína leva-nos a pensar que, nos indivíduos PAF, está a ser afectada a expressão de várias isoformas da proteína, quer por remoção, quer por a adição, de alterações pós-traducionais. Uma das alterações que poderá estar a ser adicionada às proteínas expressas nos indivíduos PAF é a glicação por metilglioxal (da Costa, et al., 2010 (submitted)).

As proteínas identificadas integram o proteoma do sangue (albumina e imunoglobulinas – Ig) ou exclusivamente da saliva (amilases). Isto pode significar que as alterações da expressão destas proteínas podem ocorrer no sangue, antes de passarem para a saliva, mas também podem ocorrer nas glândulas salivares. Por outro lado, como as proteínas mais identificadas são de expressão exclusiva das glândulas salivares, a contribuição desta expressão diferencial é maioritariamente salivar.

Tabela III-6 – Proteínas identificadas na saliva total de indivíduos controlo com expressão diferencial. (tabela completa no Anexo 4)

Spot	Proteínas identificadas				
1331	albumina sérica			receptor poli-Ig	
1614	α-amilase 2B		α-amilase 1		α-amilase pancreática
1944	α-amilase 2B			α-amilase pancreática	
4959	α-amilase 1			α-amilase 2B	
2349	glicoproteína zinco-α-2	actina citoplasmática 2 (γ)	actina ciplasmática 1 (β)		prot tipo β-actina 2
2363	glicoproteína zinco-α-2	actina citoplasmática 2 (γ)	actina citoplasmática 1 (β)		prot tipo β-actina 2
2542	albumina sérica			glicoproteína zinco-α-2	
2553	albumina sérica		glicoproteína zinco-α-2		receptor poli-Ig
2483	glicoproteína zinco-α-2				
2528	glicoproteína zinco-α-2				
2557	glicoproteína zinco-α-2				
2324	cadeia C - Ig α-1		α-amilase 2B		α-amilase 1
2373	α-amilase 2B	α-amilase 1		cadeia C - Ig α-1	cadeia C - Ig α-2
2310	α-amilase 2B	actina, α músculo		actina, α músculo	actina, músculo
				actina, γ músculo	

4. Identificação de proteínas diferenciadamente expressas em indivíduos PAF e indivíduos controlo

Tabela III-6 – Proteínas identificadas na saliva total de indivíduos controlo com expressão diferencial. (tabela completa no Anexo 4)

Spot	Proteínas identificadas				
		esquelético	cardíaco 1	liso aórtico	liso entérico
2503	receptor poli-Ig			aldolase frutose-bisfosfato A	
2477	receptor poli-Ig				
2502	receptor poli-Ig			α-amilase 2B	
2887	α-amilase 2B		α-amilase 1		albumina sérica
3138	α-amilase 2B		α-amilase 1		albumina sérica
3169	α-amilase 2B	α-amilase 1		cadeia C - Ig α-1	cadeia C - Ig α-2
3239	α-amilase 2B			α-amilase 1	
3310	cadeia C - Ig κ			cadeia C - Ig λ-1	
3251	fosfoglicerato cinase 1				
3334	cadeia C - Ig α-1	cadeia C - Ig α-2		albumina sérica	cadeia C - Ig κ
3312	triosefosfato isomerase 1				
3372	α-amilase 2B		α-amilase 1		α-amilase pancreática
3313	actina citoplasmática 2 (γ)		actina ciplasmática 1 (β)		cadeia C - Ig κ
3373	cadeia J – Ig				
3415	cadeia J – Ig				
3352	receptor poli-Ig			zimogénio granular 16 homólogo B	
3358	cadeia J – Ig			zimogénio granular 16 homólogo B	
3513	α-amilase 1			α-amilase pancreática	
3896	α-amilase 1			α-amilase 2B	
4963	α-amilase 2B		α-amilase 1		α-amilase pancreática
4964	α-amilase 2B		α-amilase pancreática		
4157	α-amilase 2B	α-amilase 1	α-amilase pancreática		POTE ankyrin domain family member F
4171	α-amilase 2B		α-amilase 1		α-amilase pancreática
4179	α-amilase 2B		α-amilase 1		proteína induzida por prolactina
4106	α-amilase 2B	α-amilase pancreática		proteína induzida por prolactina	cadeia C - Ig λ-3
4695	α-amilase 2B			α-amilase pancreática	
3585	cistatina-SN		cistatina-S		cistatina-SA

Nota: Todos os spots que não surgem na tabela correspondem a amostras contaminadas ou amostras que não continham proteína (spots 1527, 1559, 1577, 3568, 1505, 1623, 3786 e 3492). Abreviaturas: Receptor Polimérico-Ig – Receptor Poli-Ig; POTE -prostate, ovary, testis, placenta.

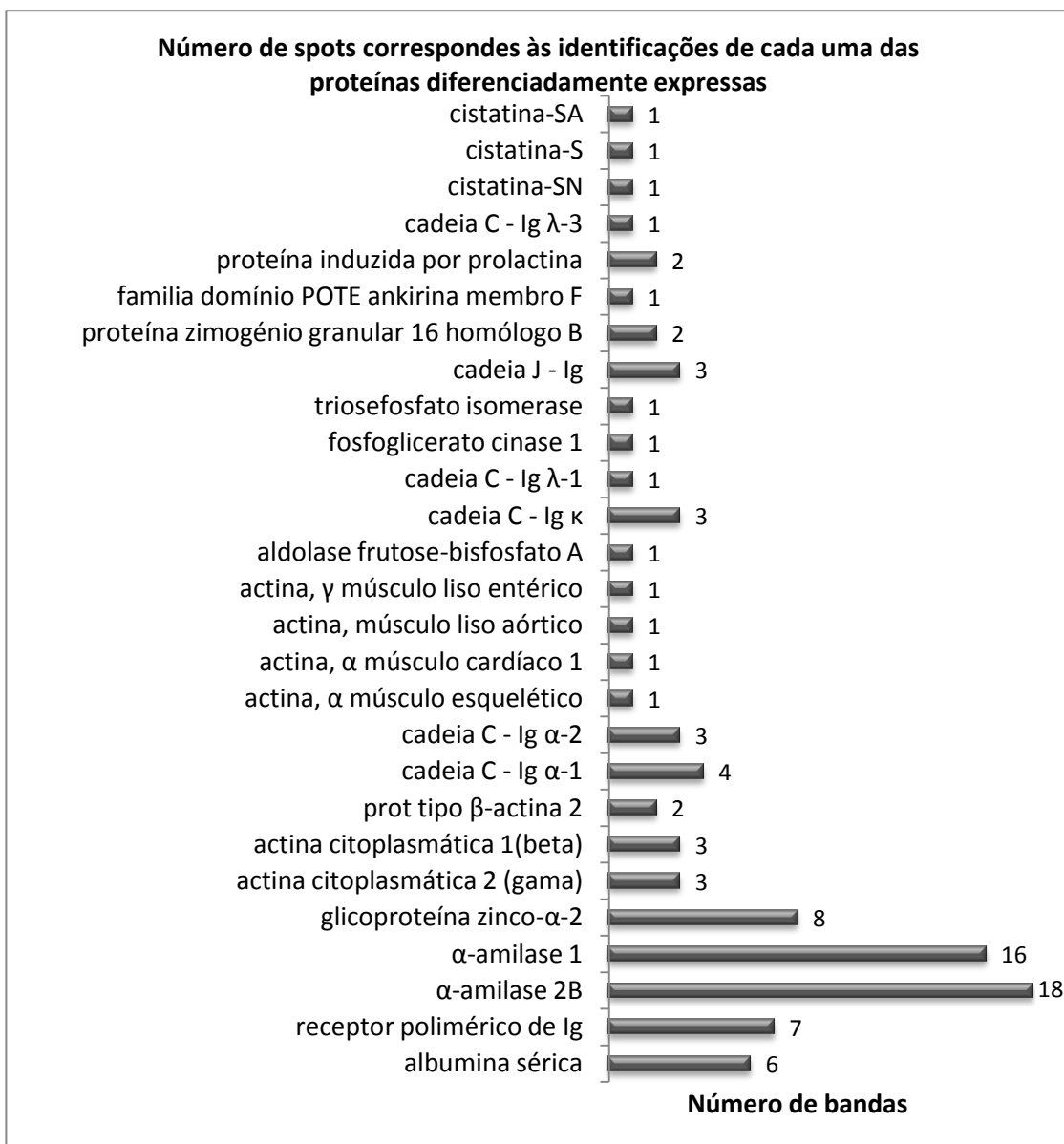


Figura III-35 – Número de spots correspondes às identificações de cada uma das proteínas diferenciadamente expressas.

5. Pesquisa de proteínas glicadas na saliva total de indivíduos PAF e de indivíduos controlo.

A glicação e o aparecimento de produtos avançados de glicação (AGEs) têm sido associados a doenças neurodegenerativas, como Parkinson (Kikuchi, et al., 2003). Apesar de existirem casos de hipoglicemia nos doentes com PAF (Ando, et al., 1991), foram recentemente identificados por espectrometria de massa, AGEs em fibras amilóides de TTR (Gomes, et al., 2005) e no soro de indivíduos com PAF, com concentrações crescentes ao longo do tempo (da Costa, et al., 2010 (submitted)) artigo no Anexo 6).

Estas espécies têm algumas características em comum com as fibras amilóides, que justificam o seu estudo neste trabalho, como a promoção de folhas β (Bouma, et al., 2003), a diminuição da solubilidade de proteínas (Luthra, et al., 1993) e a activação de RAGE (Sousa, et al., 2000), além disso o número elevado de spots identificados para as mesmas proteínas diferenciadamente expressas leva-nos a crer que estão envolvidas alterações pós-tradução diferenciais entre indivíduos PAF e controlo.

A glicação foi analisada em primeiro lugar com recurso a uma electroforese unidimensional e depois com recurso a uma electroforese bidimensional, de forma a aumentar a resolução das proteínas observadas e uma melhor caracterização das proteínas glicadas.

5.1. SDS-PAGE

À semelhança da primeira parte do trabalho, a análise de glicação proteica foi primeiro realizada em géis 1D, recorrendo à técnica de *western-blotting*, contra AGEs de argpirimidina (argp) e tetra-hidropirimidina (THP) (Figura III-36).

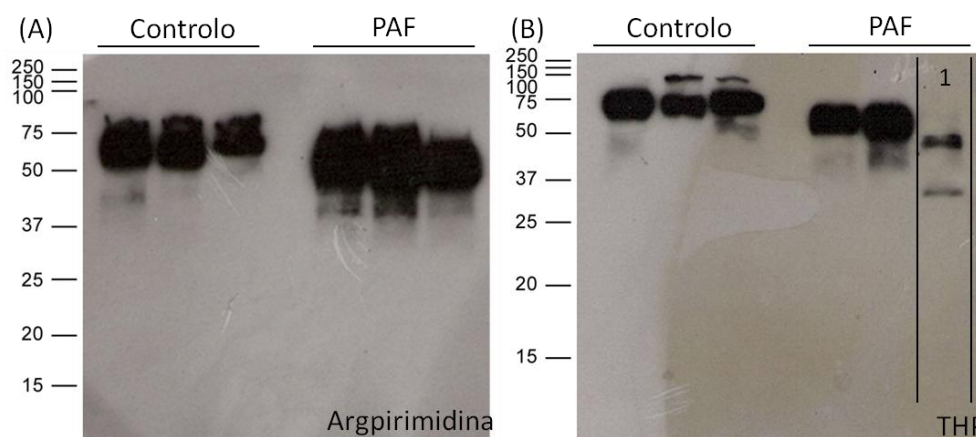


Figura III-36 – Pesquisa de proteínas glicadas por argpirimidina e tetra-hidropirimidina. (A) proteínas de saliva total de indivíduos controlo e com PAF glicadas com argp. (B) proteínas de saliva total de indivíduos controlo e com PAF glicadas com THP; a lane 1 tem um perfil de *blotting* muito diferente dos outros.

Na glicação por argpirimidina (Figura III-36 (a)) foi possível encontrar diferenças mais significativas na saliva de indivíduos PAF relativamente à saliva de indivíduos controlo, a saliva de todos os indivíduos PAF possuía uma glicação mais acentuada. Para além desse facto, parecem existir mais proteínas glicadas na saliva de indivíduos PAF, pois é visível um maior

número de bandas. Por outro lado, esta observação pode referir-se ao facto da mesma proteína surgir em várias bandas.

No caso da glicação por THP (Figura III-36 (b)) as diferenças não foram tão significativas como na experiência anterior, sendo que a saliva de alguns indivíduos PAF possuía uma maior glicação e noutros indivíduos menor. Por outro lado, o perfil do *western blot* foi diferente para todos os indivíduos. Desta forma, os resultados não foram considerados relevantes.

5.2. Electroforese bidimensional

Tendo sido obtidos resultados favoráveis para a glicação de proteínas da saliva total com argpirimidina na electroforese unidimensional, recorreu-se à electroforese bidimensional, de forma a aumentar a resolução.

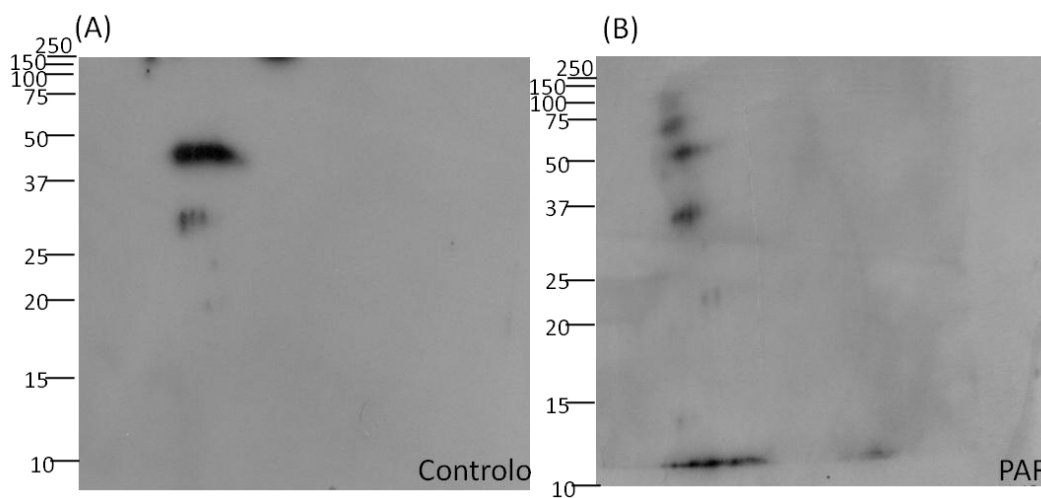


Figura III-37 – Pesquisa de proteínas glicadas por argpirimidina. (A) proteínas de saliva total de indivíduos controlo glicadas com argp. (B) proteínas de saliva total de indivíduos com PAF glicadas com argp.

À semelhança do que foi observado na experiência anterior, a glicação em PAF é mais acentuada, embora a exposição efectuada tenha sido menor (Figura III-37). Tendo em conta os resultados obtidos anteriormente (nas alíneas 2 e 3), o maior número de spots com marcação de glicação observados pode corresponder a modificações pós-traducionais ou degradação proteica.

6. Identificação das proteínas glicadas na saliva total de indivíduos PAF e de indivíduos controlo

6. Identificação das proteínas glicadas na saliva total de indivíduos PAF e de indivíduos controlo.

6.1. SDS-PAGE

A identificação das proteínas glicadas na saliva de indivíduos PAF e controlo após SDS-PAGE foi feita com recurso aos *western-blots* obtidos, fazendo uma correspondência entre as bandas de proteínas glicadas, visíveis no *western-blot*, e as bandas dos géis, através da sobreposição do filme com o gel.

Neste processo concluiu-se que as bandas das proteínas glicadas por argpirimidina correspondiam às bandas C4-C12, C15, no caso do controlo, e às bandas P4-P13, no caso de PAF (Figura III-38 (B)). As bandas correspondentes às proteínas glicadas por THP encontradas foram iguais no caso do controlo e P6-P11, P16 e P18, no caso de PAF. As duas últimas bandas foram encontradas apenas num dos indivíduos com PAF (Figura III-38 (C)).

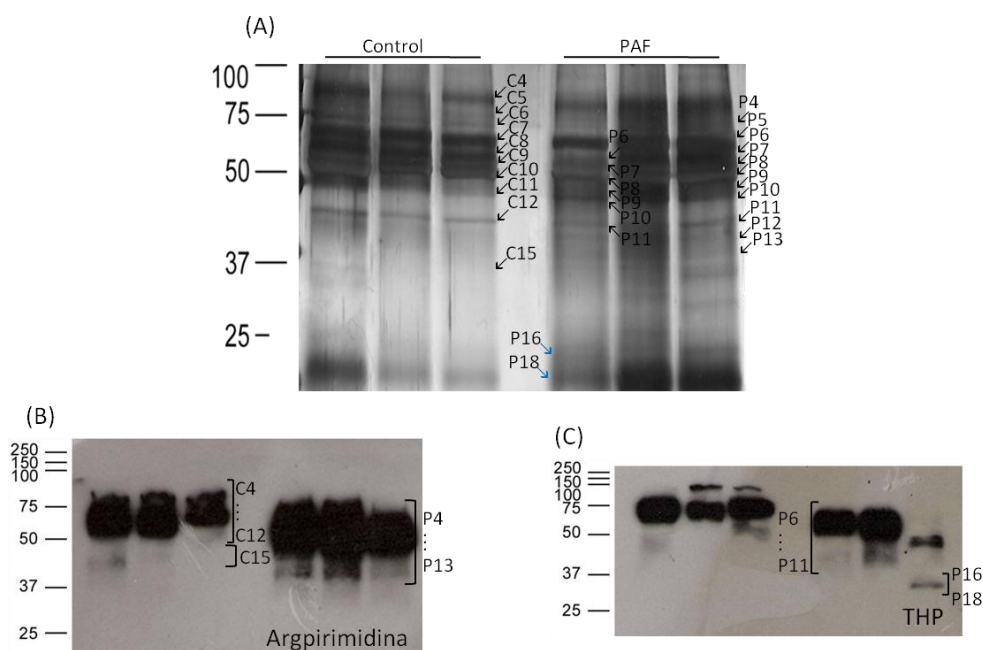


Figura III-38 – Bandas seleccionadas para identificação para PMF. (A) SDS-PAGE com marcação das bandas correspondentes a proteínas glicadas por argp (C4-C13 e C15; P4-P13) e THP (C4-C13 e C15; P6-P11, P16 e P18). As bandas P16 e P18 surgem apenas numa amostra de saliva total. (B) Western-blot com marcação para argp e com as bandas correspondentes ao SDS-PAGE. (C) Western-blot com marcação para THP e com as bandas correspondentes ao SDS-PAGE.

Estes resultados comprovam uma maior glicação por parte das proteínas da saliva PAF, verificando-se identificações repetitivas ao longo do gel de algumas proteínas.

As proteínas identificadas como glicadas (Figura III-39) têm duas origens: glândulas salivares (amilases e cistatinas) e sangue (Ig e albumina). Esta observação mostra que a glicação proteica pode ter uma origem pré ou pós-glandular. Por outro lado, tendo em conta que as proteínas do sangue foram identificadas em maior quantidade, parece haver uma maior contribuição do soro relativamente às proteínas glicadas que surgem na saliva.

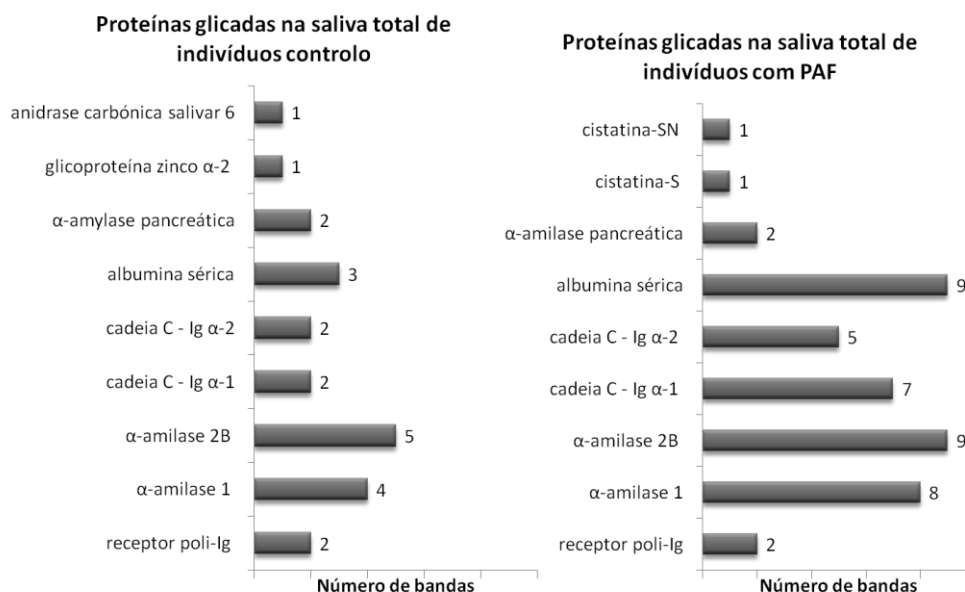


Figura III-39 – Proteínas glicadas com argp ou THP identificadas na saliva total de indivíduos controle.
Representação da quantidade de proteínas identificadas em bandas de SDS-PAGE diferentes. As proteínas anidrase carbónica salivar 6, glicoproteína zinco α-2, cistatina-S e α-amilase pancreática não tinham marcação de tetra-hidropirimidina.

6.2. Electroforese bidimensional

Para uma identificação proteica directamente a partir do gel e com maior poder de resolução recorreu-se novamente à electroforese bidimensional. Devido ao facto do western-blot unidimensional correspondente ao estudo da glicação proteica por tetra-hidropirimidina não ter revelado diferenças significativas entre a saliva de indivíduos PAF e de indivíduos controle, nesta experiência bidimensional foi apenas estudada a glicação por argpirimidina.

Os spots foram retirados apenas do gel com a saliva de indivíduos com PAF, visto que foram identificados mais spots nestes, e assumindo que os restantes *spots* correspondentes à mesma posição no gel de controle corresponderiam também a proteínas iguais (Figura III-40).

Alguns dos spots observados em western-blotting não puderam ser retirados do gel e sujeitos a identificação por espectrometria de massa, visto não terem sido encontrados no gel.

Devido ao tamanho reduzido das amostras todo o processo digestão anterior à análise por espectrometria de massa foi comprometido para a maioria das amostras, estando muitas destas contaminadas com queratina. No entanto, foi possível a identificação de algumas proteínas abundantes na saliva como mostra a Tabela III-7.

6. Identificação das proteínas glicadas na saliva total de indivíduos PAF e de indivíduos controlo

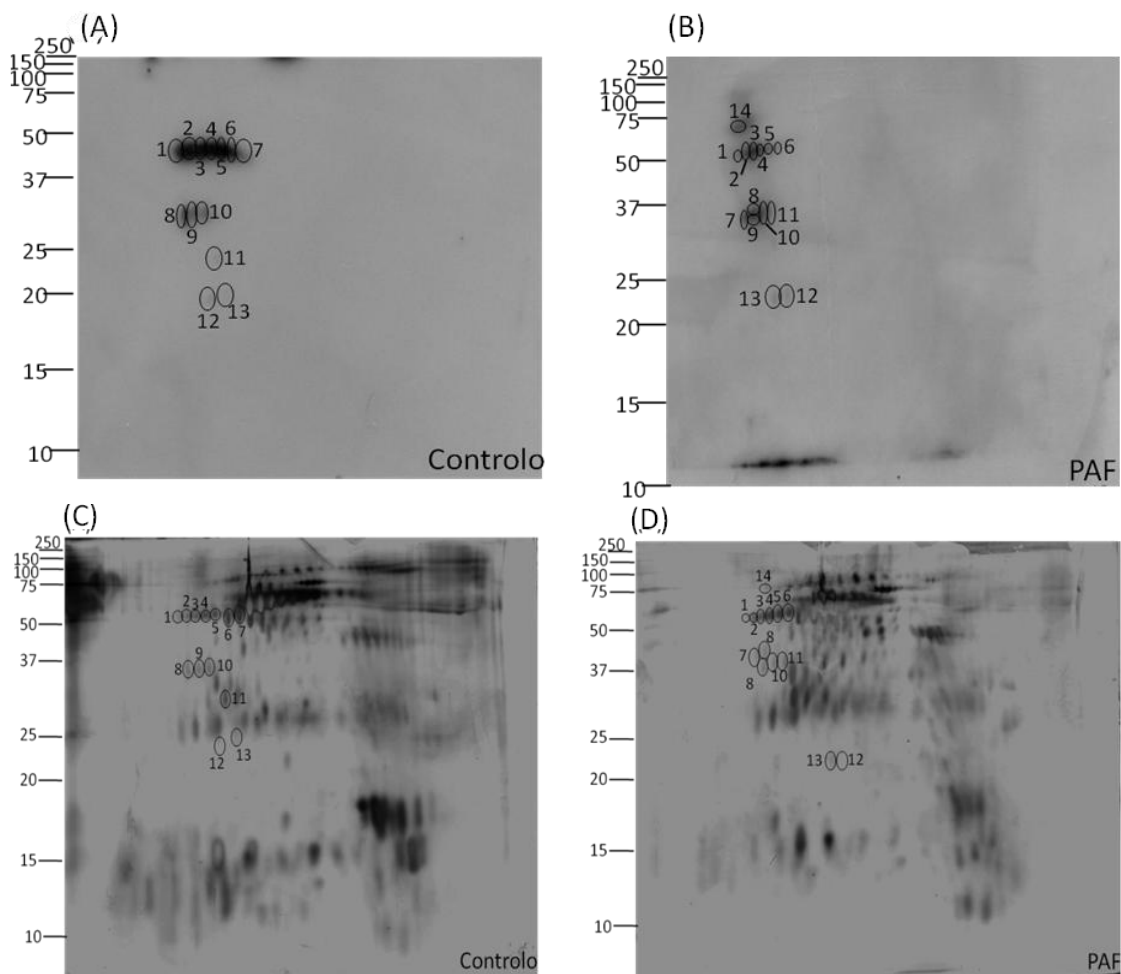


Figura III-40 – Spots de proteínas glicadas com argp da saliva total de indivíduos controlo e com PAF. (A) e (B)

Western-blot correspondente a marcação com argpirimidina na saliva total de indivíduos controlo e com PAF, respectivamente, com a marcação numérica dos spots sujeitos a PMF. (C) e (D) Géis bidimensionais com os spots correspondentes à marcação com argp, da saliva total de indivíduos controlo e com PAF, respectivamente, com a marcação numérica dos spots sujeitos a PMF.

Tabela III-7 – Proteínas identificadas na saliva total de indivíduos controlo com expressão diferencial. A queratina identificada é encontrada frequentemente na cavidade bucal (www.uniprot.org).

Spot	Proteínas identificadas
1	queratina tipo II (citoesquelético, epidermal 2)
12	α -amilase 1
12	α -amilase 2B
12	α -amilase pancreática

A queratina identificada no *spot* 1 não foi considerada como contaminação devido ao facto de surgir maioritariamente na cavidade bucal (Bloor, et al., 2003), ao contrário das queratinas contaminantes que provêm em grande parte da pele ou do cabelo.

Os amilases já tinham sido identificados através do SDS-PAGE como glicadas por argpirimidina, facto que se conseguiu comprovar nesta experiência.

Os spots 3, 5, 7, 8, 9, 11, 13 e 14, não foi possível confirmar a presença de nenhuma proteína e os restantes estavam contaminados com queratina.

7. Variação da glicação de proteínas da saliva total em indivíduos PAF transplantados com fígado *wild type* (wt) e em indivíduos com doenças hepáticas terminais transplantados com fígado PAF.

A partir dos resultados anteriores pode inferir-se que algumas das proteínas existentes na saliva total se encontram glicadas com maior extensão nos indivíduos com PAF. Desta forma pode considerar a hipótese que este facto pode estar relacionado com a patogénese da doença.

Tendo em conta que a única forma de tratamento bem sucedida para esta doença é o transplante hepático a partir de um dador cadáver (Jonsen, et al., 2001), o estudo da evolução da glicação proteica em indivíduos transplantados com fígados *wt* para a TTR, poderá indicar se de facto existe alguma relação entre a glicação de proteínas da saliva total destes indivíduos e a evolução da doença.

Com a recente utilização de fígados produtores de TTR mutada para o transplante de indivíduos com doenças hepáticas terminais como cirrose hepática e cancro (Ferrão, 2006), também é possível verificar com maior exactidão a possível relação entre o aparecimento de sintomas de PAF e o aumento da glicação.

Este estudo foi realizado com o recurso a saliva total de indivíduos com PAF com transplantes de fígado *wt* de 12 (24) e 36 meses, e saliva total de indivíduos com doenças hepáticas terminais com transplantes de fígado PAF de 5, 14, 16 e 31 meses. Foi estudada apenas a evolução da glicação por argpirimidina pelas razões apresentadas anteriormente (na alínea 6.2).

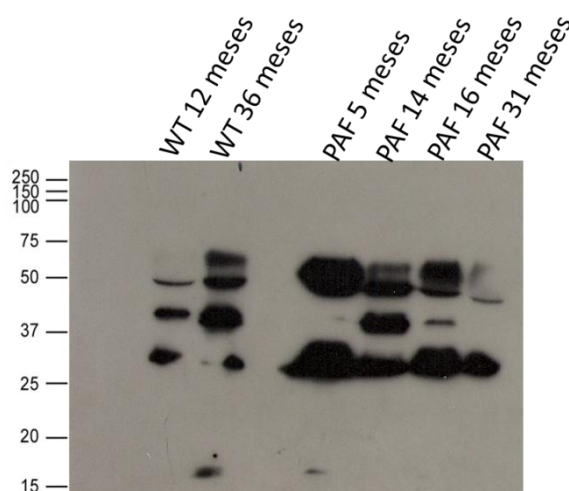


Figura III-41 – Evolução da glicação proteica com argpirimidina em PAF ao longo do tempo. A sigla WT corresponde a saliva total indivíduos com PAF transplantados com fígado *wt* de dador cadáver e a sigla PAF corresponde a saliva total de indivíduos com doença hepática terminal transplantados com fígado PAF.

Na Figura III-, é visível uma variação da glicação proteica por argpirimidina, no entanto, o aumento ou a diminuição desta ao longo do tempo não parece ser linear, pelo que é difícil inferir sobre estes resultados.

8. Variação da composição de TTR monomérica e tetramérica

8. Variação da composição de TTR monomérica e tetramérica.

Em vários estudos foi já mencionada uma relação entre a evolução da doença e a composição na forma monomérica e tetramérica da TTR, no sangue. Esta relação indica um aumento da composição da forma monomérica (considerada mais prejudicial) da proteína em detrimento da sua forma tetramérica (nativa) (Ando, et al., 2005).

À semelhança do que se verificou em estudos anteriores ((da Costa, et al., 2010) artigo no Anexo 6), na saliva também é visível uma alteração da composição destas duas formas (Figura III-42).

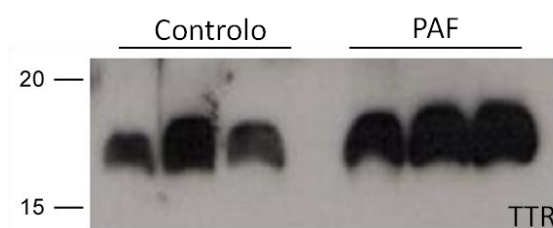


Figura III-42 – Composição de TTR monomérica na saliva total de indivíduos controlo e com PAF.

Na figura é visível um aumento na composição da forma monomérica de TTR na saliva PAF.

IV. Discussão

IV. Discussão

Este trabalho teve como principal objectivo a pesquisa de biomarcadores na saliva de indivíduos paramiloidóticos. Os biomarcadores poderão constituir uma forma de diagnóstico pré-sintomático, o que torna a sua pesquisa essencial para um tratamento atempado e o impedimento da evolução desta doença.

Desta forma, foram considerados alguns factores que levaram à escolha da saliva total como fluido diagnóstico e principalmente do estudo da glicação como biomarcador.

Em primeiro lugar, o facto de existirem infiltrações de fibras amilóides de TTR nas glândulas salivares de indivíduos com PAF (Macedo, et al., 2007), que poderiam alterar funções celulares como a expressão proteica e as modificações pós-traducionais. Em segundo, a saliva constitui um fluido de recolha fácil, pois não requer um método invasivo, o seu armazenamento e transporte também são fáceis, e a sua manipulação é simples. Como já foi referido, é composta por proteínas expressas nas glândulas salivares, mas também é um filtrado das proteínas sangue, as observações realizadas no soro podem-se manifestar na saliva desses indivíduos (Yan, et al., 2009).

Por outro lado, estudos no nosso laboratório, demonstraram que o soro de indivíduos PAF apresenta mais proteínas glicadas que o soro de indivíduos controlo (da Costa, et al., 2010 (submitted)).

Partindo destes princípios e com recurso a várias técnicas de separação, *immunoblotting* e identificação proteica, foi possível observar alterações ao nível do proteoma salivar dos indivíduos com PAF.

Em primeiro lugar, foram realizadas análises electroforéticas unidimensionais que permitiram detectar variações ao nível do perfil electroforético da saliva. Foi possível verificar variações no perfil da α -sinucleína, podendo remeter para outros estudos de análise desta proteína como potencial biomarcador para a PAF. Esta proteína encontra-se associada a diversas patologias amilóides, pelo que esta descoberta se poderá revelar da maior importância neste domínio. As variações no perfil electroforético podem também reflectir alterações a nível pós-traducional.

Em segundo lugar, foram observadas diferenças nas experiências de 2D a nível da expressão de determinadas proteínas exclusivas da saliva²² e de proteínas provenientes do soro²³. A presença de alterações na expressão de proteínas exclusivas da saliva e de proteínas do soro, reflecte, não apenas, uma contribuição do soro, mas também, uma participação activa das glândulas salivares nas alterações observadas nestas experiências.

Por fim, com recurso ao *western-blotting*, foi possível identificar alterações a nível pós-traducional, nomeadamente AGEs ou glicação por metilglioxal. Este processo ocorre num

²² α -amilase 2B, α -amilase 1, cistatina-SN, cistatina-S, cistatina-SA

²³ albumina sérica, cadeia C - Ig α -1, cadeia C - Ig α -2, cadeia C - Ig κ , cadeia C - Ig λ -1, cadeia J - Ig, cadeia C - Ig λ -3, glicoproteína zinco- α -2, receptor polimérico de Ig, actina citoplasmática 1 (β), actina citoplasmática 2 (γ), proteína tipo β -actina 2 (κ), actina α do músculo esquelético, actina α do músculo cardíaco 1, actina do músculo liso aórtico, actina γ do músculo liso entérico, aldolase frutose-bisfosfato A, fosfoglicerato cinase 1, triosefosfato isomerase, POTE ankyrin domain family member F, proteína induzida por prolactina, proteína zimogénio granular 16 homólogo B

IV. Discussão

maior número de proteínas na saliva de indivíduos com PAF e, à semelhança do que acontece com as alterações na expressão proteica mencionadas anteriormente, ocorre diferenciadamente em proteínas provenientes das glândulas salivares e de proteínas presentes no soro, com maior contribuição das proteínas do soro.

Grande parte das proteínas identificadas como glicadas diferenciadamente apresentam-se também como expressas diferenciadamente na saliva de indivíduos PAF. Parece assim existir uma relação entre os dois fenómenos. De facto, os indivíduos PAF apresentam uma maior glicação nas proteínas do soro, e essas, por se apresentarem modificadas, podem ter o seu processo de filtração do soro para a saliva dificultado, devido à insolubilidade causada pela glicação.

Do conjunto dos resultados obtidos foi possível concluir que a TTR, como “proteína precursora” da PAF, sofre alterações na estabilidade do seu tetrâmero também na saliva, apresentando uma composição maior da sua estrutura monomérica, confirmando os resultados obtidos anteriormente para o soro (da Costa, et al., 2009) e como é amplamente descrito *in vitro* (Buxbaum, 2007).

Conclui-se ainda que, para além da α -sinucleína, outras proteínas que se encontram diferenciadamente expressas na saliva de indivíduos PAF, nomeadamente proteínas glicadas, podem ser utilizadas como potenciais biomarcadores do desenvolvimento de sintomas de PAF.

1. Investigação Futura

- Estabelecer valores de referência para as proteínas que apresentem expressão diminuída e/ou glicação na saliva dos indivíduos com PAF.
- Verificar, nos portadores da mutação portuguesa assintomáticos, se as alterações observadas se mantêm. Caso esta observação seja negativa estamos na presença de bons biomarcadores para o desenvolvimento de sintomas.
- Procurar compreender o papel da α -sinucleína a nível funcional e não apenas como biomarcador.
- Investigar os mecanismos bioquímicos e fisiológicos que suportam a glicação diferencial associada a polineuropatia amiloidótica familiar.

V. Referências

V. Referências

V. Referências

V. Referências

(s.d.). Obtido em 2010, de

http://www.imbjena.de/~rake/Bioinformatics_WEB/proteins_purification.html

(s.d.). Obtido de www.uniprot.org

(2010). Obtido de http://www.skbucl.edu/cgi-bin/hspmscgi-bin/search_pro_c.cgi

(2010). Obtido de <http://www.salivarium.ucsf.edu/submit?page=ProteinList>

Alexeev, V., & Yoon, K. (1998). Stable and inheritable changes in genotype and phenotype of albino melanocytes induced by an RNA/DNA oligonucleotide. *Nature Biotechnology*, 16, pp. 1343–1346.

Almeida, M., Alves, I., Sakaki, Y., Costa, P., & Saraiva, M. (1990). Prenatal diagnosis of familial amyloidotic polyneuropathy: evidence for an early expression of the associated transthyretin methionine-30. *Human Genetics*, 85, pp. 623-626.

Almeida, M., Alves, I., Terazaki, H., Ando, Y., & Saraiva, M. (2000). Comparative studies of two transthyretin variants with protective effects on familial amyloidotic polyneuropathy: TTR R104M and TTR119M. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 270, pp. 1024-1028.

Almeida, V., Costa, P., Moreira, P., Gonçalves, J., & Braga, J. (2005). Birth of two healthy females after preimplantation genetic diagnosis for familial amyloid polyneuropathy. *Reproductive BioMedicine Online*, 10, pp. 641-644.

Altland, K., & Banzhoff, A. (1986). Separation by hybrid isoelectric focusing of normal transthyretin (prealbumin) and a variant with a methionine for valine substitution associated with familial amyloidotic polyneuropathy. *Electrophoresis*, 7, pp. 529-533.

Alves, I., Divino, C., Schussler, G., Altland, K., Almeida, M., Palha, J., et al. (1993). Thyroxine binding in a TTR Met 119 kindred. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 77, pp. 484–488.

Ancsin, J. (2003). Amyloidogenesis: historical and modern observations point to heparan sulfate proteoglycans as a major culprit. *Amyloid*, 10, pp. 67-79.

Andersson, R. (1976). Familial Amyloidosis with Polyneuropathy: A Clinical Study Based on Patients Living in Northern Sweden. *Acta Medica Scandinavica*, 590, pp. 1-64.

Ando, Y., Nakamura, M., & Araki, S. (2005). Transthyretin-related familial amyloidotic polyneuropathy. *Archives of Neurology*, 62, pp. 1057–1062.

Ando, Y., Tanaka, Y., Nakazato, M., Ericzon, B., Yamashita, T., Tashima, K., et al. (1995). Change in variant transthyretin levels in patients with familial amyloidotic polyneuropathy type I following liver transplantation. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 211, pp. 354–358.

V. Referências

- Ando, Y., Yi, S., Nakagawa, T., Ikegawa, S., Hirota, M., Miyazaki, A., et al. (1991). Disturbed metabolism of glucose and related hormones in familial amyloidotic polyneuropathy: Hypersensitivities of the autonomic nervous system and therapeutic prevention. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 35, pp. 63-70.
- Andrade, C. (1951 a). A peculiar form of peripheral neuropathy. *Acta Psych Neurologica Scandinavica*, 26, pp. 3-4.
- Andrade, C. (1952). A peculiar form of peripheral neuropathy. *Brain*, 75, pp. 408-427.
- Andrade, C. (1951 b). Note préliminaire sur une forme particulière de neuropathie périphérique. *Revue Neurologique*, 85, pp. 302-306.
- Antunes, L., Ribeiro Rosário, M., Barros, F., Silva, P., & Coelho, B. (1963). Études sur la paramyloïdose portugaise à forme polynévritique (type C. Andrade): I-Remarques sur le tableau clinique et résultats de quelques examens complémentaires. *Acta Neuropathologica*, 2, pp. 12-18.
- Araki, S., Mawatari, S., Ohta, M., Nakajima, A., & Kuroiwa, Y. (1968). Polyneuritic amyloidosis in a Japanese family. *Archives of Neurology*, 18, pp. 593-602.
- Aydin, S. (2007). A comparison of ghrelin, glucose, alpha-amylase and protein levels in saliva from diabetics. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 40, pp. 29–35.
- Baures, P., Oza, V., Peterson, S., & Kelly, J. (1999). Synthesis and evaluation of inhibitors of transthyretin amyloid formation based on the non-steroidal anti-inflammatory drug, flufenamic acid. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 7, pp. 1339–1347.
- Becker, P., Antunes, L., Ribeiro do Rosário, M., & Barros, F. (1964). Paramyloidose der peripheren Nerven in Portugal. 37, pp. 329-364.
- Bellovino, D., Morimoto, T., Pisaniello, A., & Gaetani, S. (1998). In vitro and in vivo studies on transthyretin oligomerization. *Experimental Cell Research*, 243, pp. 101-112.
- Bellovino, D., Morimoto, T., Tosetti, F., & Gaetani, S. (1996). Retinol binding protein and transthyretin are secreted as a complex formed in the endoplasmic reticulum in HepG2 human hepatocarcinoma cells. *Experimental Cell Research*, 222, pp. 77-83.
- Bienvenut, W. (2005). INTRODUCTION: PROTEIN ANALYSIS USING MASS SPSECTROMETRY. In W. Bienvenut, *Acceleration and Improvement of Protein Identification by Mass Spectrometry* (pp. 1–118). Netherlands: Springer.
- Biorad. *Biorad protein assay protocol*.
- Biorad *protein assay protocol*.
- Bio-Rad. (s.d.). Quick Start™ Bradford Protein Assay: Instruction Manual.
- Bio-Rad. (s.d.). Western Blotting Products: A Complete Source for All Your Blotting Needs.

- Blake, C., Geisow, M., Oatley, S., Rerat, B., & Rerat, C. (1978). Structure of prealbumin: secondary, tertiary and quaternary interactions determined by Fourier refinement at 1.8 Å. *Journal of Molecular Biology*, 121, pp. 339-56.
- Blake, C., Geisow, M., Swan, I., Rerat, C., & Rerat, B. (1974). Structure of human plasma prealbumin at 2-5 Å resolution. A preliminary report on the polypeptide chain conformation, quaternary structure and thyroxine binding. *Journal of Molecular Biology*, 88, pp. 1-12.
- Bloor, B., Tidman, N., Leigh, I., Odell, E., Dogan, B., Wollina, U., et al. (2003). Expression of Keratin K2e in Cutaneous and Oral Lesions: Association with Keratinocyte Activation, Proliferation, and Keratinization. *American Journal of Pathology*, 162, pp. 963-975.
- Bouma, B., Kroon-Batenburg, L., Wu, Y.-P., Brunjes, B., Posthuma, G., Kranenburg, O., et al. (2003). Glycation Induces Formation of Amyloid Cross-beta Structure in Albumin. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 278, pp. 41810-41819.
- Bouma, B., Kroon-Batenburg, L., Wu, Y.-P., Brunjes, B., Posthuma, G., Kranenburg, O., et al. (2003). Glycation Induces Formation of Amyloid Cross-beta Structure in Albumin. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 278, pp. 41810-41819.
- Brett, M., Persey, M., Reilly, M., Revesz, T., Booth, D., Booth, S., et al. (1999). Transthyretin Leu12Pro is associated with systemic, neuropathic and leptomeningeal amyloidosis. *Brain*, 122, pp. 183-190.
- Bucciarelli, L. G., Wendt, T., Rong, L., Lalla, E., Hofmann, M. A., Goova, M. T., et al. (2002). RAGE is a multiligand receptor of the immunoglobulin superfamily: implications for homeostasis and chronic disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59, pp. 1117-1128.
- Buxbaum, J. (2007). Transthyretin and the Transthyretin Amyloidosis. In V. Uversky, & A. Fink, *Protein Misfolding, Aggregation and Conformational Diseases: Part B Molecular Mechanisms of conformational Diseases* (Vol. 6, pp. 259-283). Springer Science + Business Media, LLC.
- Cardoso, I., Goldsbury, C., Muller, S., Olivieri, V., Wirtz, S., Damas, A., et al. (2002). Transthyretin fibrillogenesis entails the assembly of monomers: a molecular model for in vitro assembled transthyretin amyloid-like fibrils. *Journal of Molecular Biology*, 317, pp. 683-695.
- Chiappin, S., Antonelli, G., Gatti, R., & De Palo, E. (2007). Saliva specimen: A new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clinica Chimica Acta*, 383, pp. 30-40.
- Coelho, T. (2006). Diagnóstico Clínico da Polineuropatia Amiloidótica Familiar. *Sinapse*, 6, pp. 134-137.
- Coelho, T., Carvalho, M., Saraiva, M., Alves, I., Almeida, M., & Costa, P. (1993). A strikingly benign evolution of FAP in an individual found to be a compound heterozygote for two TTR mutations: TTR Met 30 and TTR Met 119. *The Journal of Rheumatology*, 20, p. 179.
- Coelho, T., Chorão, R., Sousa, A., Alves, I., Torres, M., & Saraiva, M. (1996). Compound heterozygotes of transthyretin Met 30 and transthyretin Met 119 are protected from the devastating effects of familial amyloidotic polyneuropathy. *Neuromuscular Disorders*, 6, p. 20.

V. Referências

- Coelho, T., Sousa, A., Lourenço, E., & Ramalheira, J. (1994). A study of 159 Portuguese patients with familial amyloidotic polyneuropathy (FAP) whose parents were both unaffected. *Journal of Medical Genetics*, 31, pp. 293-299.
- Coleman, M. (2005). Axon degeneration mechanisms: commonality amid diversity. *Nature Reviews Neuroscience*, 6, pp. 889-898.
- Conceição, I. (2006). Clínica e História Natural da Polineuropatia Amiloidótica Familiar. *Sinapse*, 6, pp. 86-91.
- Connors, L., Lim, A., Prokaeva, T., Roskens, V., & Costello, C. (2003). Tabulation of human transthyretin (TTR) variants, 2003. *Amyloid*, 10, pp. 160-184.
- Continho, P., Macedo, E., Estacio, A., Saraiva, A., Costa, P., & Saraiva, M. (1988). Periodic plasma exchanges in treatment of familial amyloid polyneuropathy: preliminary results. In T. Isobe, S. Araki, F. Uchino, S. Kito, & E. Tsubura, *Amyloid and amyloidosis* (pp. 845-849). New York: Plenum Press.
- Costa, P., & Costa, P. (1998). The future of selective apheresis in FAP. *Amyloid*, 5, pp. 143-144.
- Costa, P., Figueira, A., & Bravo, F. (1978). Amyloid fibril protein related to prealbumin in familial amyloidotic polyneuropathy. *Proceedings of the National Academic of Science of the USA*, 75, pp. 4499-4503.
- Costa, P., Teixeira, A., Saraiva, M., & Costa, P. (1993). Immunoassay for TTR variants associated with amyloid neuropathy. *Scandinavian Journal of Immunology*, 38, pp. 177-182.
- da Costa, G., Gomes, R., Correia, C., Freire, A., Monteiro, E., Martins, A., et al. (2009). Identification and quantitative analysis of human transthyretin variants in human serum by Fourier transform ion-cyclotron resonance mass spectrometry. *Amyloid*, 16(4).
- da Costa, G., Gomes, R., Guerreiro, A., & Mateus, E. (2010 (submitted)). LOOKING BEYOND GENETIC FACTORS IN FAMILIAL AMYLOIDOTIC POLYNEUROPATHY: PROTEIN GLYCATION AND CHAPERONE ACTIVITY LOSS. *PNAS*.
- da Costa, G., Guerreiro, A., Correia, C., Gomes, R., Freire, A., Monteiro, E., et al. (2010). A non-invasive method based on saliva to characterize TTR in FAP patients using FT-ICR high-resolution mass spectrometry. *PROTEOMICS - Clinical Applications*.
- Davies, A., Douglas, L., Hendrich, J., Wratten, J., Minh, A., Foucault, I., et al. (2006). The calcium channel $\alpha_2\delta$ -2 subunit partitions with Cav2.1 into lipid rafts in cerebellum: implications for localization and function. *The Journal of Neuroscience*, 26, pp. 8748-8757.
- de Carvalho, M. (2006). Diagnóstico Neurofisiológico na Polineuropatia Amiloidótica Familiar. *Sinapse*, 6, pp. 143-146.
- Dickson, P., Howlett, G., & Schreiber, G. (1982). Metabolism of prealbumin in rats and changes induced by acute inflammation. *European Journal of Biochemistry*, 129, pp. 289-293.

- Ding, Q., & Keller, J. (2005). Evaluation of rage isoforms, ligands, and signaling in the brain. *Biochimica et Biophysica Acta* , 1746, pp. 18–27.
- Esser, D., Alvarez-Llamas, G., de Vries, M., Weening, D., Vonk, R., & Roelofsen, H. (2008). Sample Stability and Protein Composition of Saliva: Implications for Its Use as a Diagnostic Fluid. *Biomarker Insights* , 3, pp. 25–37.
- Ferrão, J. (2006). Transplante Hepático Sequencial (Dominó) – Alargar a Esperança? *Sinapse* , 6, pp. 155-157.
- Foguel, D., Suarez, M., Ferrao-gonzales, A., Porto, T., Palmieri, L., Einsiedler, C., et al. (2003). Dissociation of amyloid fibrils of alpha-synuclein and transthyretin by pressure reveals their reversible nature and formation of water-excluded cavities. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* , 100, pp. 9831-9836.
- FoldRx Pharmaceuticals. (2010). Data presented demonstrate that tafamidis significantly halts or slows disease progression and reduces burden of disease in patients with TTR amyloid polyneuropathy.
- Furtado, E. (2006). Transplantação Hepática na Polineuropatia Amiloidótica Familiar. *Sinapse* , 6, pp. 151-154.
- Gamper, H. J., Cole-Strauss, A., Metz, R., Parekh, H., & Kumar, R. K. (2000 a). A plausible mechanism for gene correction by chimeric oligonucleotides. *Biochemistry* , 39, pp. 5808–5816.
- Gamper, H., Parekh, H., Rice, M. B., Youkey, H., & Kmiec, E. (2000 b). The DNA strand of chimeric RNA/DNA oligonucleotides can direct gene repair/conversion activity in mammalian and plant cell-free extracts. *Nucleic Acids Research* , 28, pp. 4332–4339.
- GE Healthcare. (2004). 2-D Electrophoresis: Principles and Methods. pp. 43-44.
- Getz, R., Kennedy, B., & Mangini, N. (1999). Transthyretin localization in cultured and native human retinal pigment epithelium. *Experimental Eye Research* , 68, pp. 629-639.
- Gomes, R., Sousa Silva, M., Quintas, A., Cordeiro, C., Freire, A., Pereira, P., et al. (2005). Argpyrimidine, a methylglyoxal-derived advanced glycation end-product. *The Biochemical Journal* , 385, pp. 339-345.
- Guimarães, A., Monteiro, L., & Coutinho, P. (1980). Pathology of the autonomic nervous system in Andrade type of familial amyloidotic polyneuropathy. In G. Glenner, P. Costa, & A. (. de Freitas, *Amyloid and Amyloidosis* (pp. 88-98). Amsterdam: Excerpta Medica.
- Guo, T., Oswald, L., Mendu, D., & Soldin, S. (2007). Determination of levetiracetam in human plasma/serum/saliva by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta* , 375(1–2), pp. 115–118.
- Hagewald, S. J., Fishel, D. L., Christan, C. E., Bernimoulin, J., & Kage, A. (2003). Salivary IgA in response to periodontal treatment. *European Journal of Oral Science* , 111, pp. 203–208.

V. Referências

- Hamilton, J., Steinrauf, L., Braden, B., Liepnieks, J., Benson, M., Holmgren, G., et al. (1993). The x-ray crystal structure refinements of normal human transthyretin and the amyloidogenic Val-30-->Met variant to 1.7-Å resolution. *The Journal of Biological Chemistry*, 268, pp. 2416-2424.
- Hammarstrom, P., Sekijima, Y., White, J., Wiseman, R., Lim, A., Costello, C., et al. (2003). D18G transthyretin is monomeric, aggregation prone, and not detectable in plasma and cerebrospinal fluid: a prescription for central nervous system amyloidosis? *Biochemistry*, 42, pp. 6656-6663.
- Hammarstrom, P., Wiseman, R., Powers, E., & Kelly, J. (2003). Prevention of transthyretin amyloid disease by changing protein misfolding energetics. *Science*, 299, pp. 713-716.
- Haraoka, K., Ando, Y., Ando, E., Sandgren, O., Hirata, A., Nakamura, M., et al. (2002). Amyloid deposition in ocular tissues of patients with familial amyloidotic polyneuropathy (FAP). *Amyloid*, 9, pp. 183-189.
- Hazenbergh, B., Marrink, J., Nakazato, M., Limburg, P., Sibinga, C., Bijzet, J., et al. (1990). The effect of plasma exchange on serum levels of TTR Met 30 in a patient with FAP type I. In P. Costa, *Familial Amyloidotic Polyneuropathy and Other Transthyretin Related Disorders* (pp. 371-374). Porto: Arquivos de Medicina.
- Herbert, J., Wilcox, J., Pham, K., Fremeau, R., Zaviani, M., Dwork, A., et al. (1986). Transthyretin: a choroid plexus-specific transport protein in human brain. *Neurology*, 36, pp. 900-911.
- Holmgren, G., Steen, L., Ekstedt, J., Groth, C., Ericzon, B., Eriksson, S., et al. (1991). Biochemical effect of liver transplantation in two Swedish patients with familial amyloidotic polyneuropathy (FAP-met30). *Clinical Genetics*, 40 (3), pp. 242-6.
- Hou, X., Aguilar, M., & Small, D. (2007). Transthyretin and familial amyloidotic polyneuropathy: Recent progress in understanding the molecular mechanism of neurodegeneration. *FEBS Journal*, 274, pp. 1637-1650.
- Hou, X., Parkinson, H., Coleman, H., Mechler, A., Martin, L., Aguilar, M., et al. (2007). Transthyretin oligomers induce calcium influx via voltage-gated calcium channels. *Journal of Neurochemistry*, 100, pp. 446-457.
- Hou, X., Richardson, S., Aguilar, M., & Small, D. (2005). Binding of amyloidogenic transthyretin to the plasma membrane alters membrane fluidity and induces neurotoxicity. *Biochemistry*, 44, pp. 11618-11627.
- Hu, S., Wang, J., Meijer, J., leong, S., Xie, Y., Yu, T., et al. (2007 a). Salivary proteomic and genomic biomarkers for primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheumatism*, 56, pp. 3588-3600.
- Hu, S., Yu, T., Xie, Y., Yang, Y., & al, e. (2007 b). Discovery of oral fluid biomarkers for human oral cancer by mass spectrometry. *Cancer Genomics Proteomics*, 4, pp. 55-64.

- Ikegawa, S., Tanase, S., Morino, Y., Yi, S., Ando, Y., Miyazaki, A., et al. (1988). Evaluation of serum variant prealbumin levels, and its behavior after plasma exchange for familial amyloidotic polyneuropathy (type 1). In T. Isobe, S. Araki, F. Uchino, S. Kito, & E. Tsubura, *Amyloid and amyloidosis* (pp. 839–844). New York: Plenum Press.
- Izumoto, S., Younger, D., Hays, A., Martone, R., Smith, R., & Herbert, J. (1992). Familial amyloidotic polyneuropathy presenting with carpal tunnel syndrome and a new transthyretin mutation, asparagine 70. *Neurology*, 42, pp. 2094-2102.
- Jacobsson, B. (1989 a). Localization of transthyretin mRNA and of immunoreactive transthyretin in the human fetus. *Virchows Archives Pathology Anatomy*, 415, pp. 259-263.
- Jacobsson, B., Collins, V., Grimelius, L., Pettersson, T., Sandstedt, B., & Carlstrom, A. (1989 b). Transthyretin immunoreactivity in human and porcine liver, choroid plexus, and pancreatic islets. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 37, pp. 31-37.
- Jonsen, E., Suhr, O., Tashima, K., & Athlin, E. (2001). Early liver transplantation is essential for familial amyloidotic polyneuropathy patients' quality of life. *Amyloid*, 8, pp. 52-7.
- Jouquan, J., Pennec, Y., Mottier, D. B., Morin, J., Youinou, P., & Garre, M. (1983). Retinol carrier protein, prealbumin and transferrin. Influence of age and sex on the serum concentration of proteins with a short half-life. *Presse Medicale*, 12, p. 1877.
- Julião, O., & Mignone, C. (1955). Amiloidose primária com comprometimento meningo-radículo-neurítico. *Arquivos Neuro-psiquiatria (S Paulo)*, 13, pp. 1-12.
- Kanda, Y., Goodman, D., Canfield, R., & Morgan, F. (1974). The amino acid sequence of human plasma prealbumin. *The Journal of Biological Chemistry*, 249, pp. 6796-6805.
- Kelly, J., & Lansbury, P. J. (1994). A chemical approach to elucidate the mechanism of transthyretin and beta- protein amyloid fibril formation. *Amyloid*, 1, pp. 186-205.
- Kikuchi, S., Shinpo, K., Takeuchi, M., & Yamagishi, S. (2003). *Brain Research Reviews*, 41, pp. 306–323.
- Kikuchi, S., Shinpo, K., Takeuchi, M., & Yamagishi, S. (2003). Involvement of Advanced Glycation End-products (AGEs) in Alzheimer's Disease. *Brain Research Reviews*, 41, pp. 306-323.
- Kito, S., Itoga, E., Kamiya, K., Kishida, T., & Yamamura, Y. (1980). Studies on Familial Amyloid Polyneuropathy in Ogawa Village, Japan. *European Journal of Neurology*, 19, pp. 141-151.
- Koike, H., Misu, K., Ikeda, S., Ando, Y., Nakasato, M., Ando, E., et al. (2002). Type I (Transthyretin Met30) Familial Amyloid Polyneuropathy in Japan: early- vs late-onset form. *Archives of Neurology*, 59, pp. 1771-1776.
- Kren, B., Bandyopadhyay, P., & Steer, C. (1998). In vivo site-directed mutagenesis of the factor IX gene by chimeric RNA/DNA oligonucleotide. *Nature Medicine*, 4, pp. 285–290.

V. Referências

- Kren, B., Cole-Strauss, A., Kmiec, E., & Steer, C. (1997). Targeted nucleotide exchange in the alkaline phosphatase gene of HuH-7 cells mediated by a chimeric RNA/DNA oligonucleotide. *Hepatology*, 25, pp. 1462–1468.
- Kren, B., Parashar, B., Bandyopadhyay, P., Chowdhury, N., Chowdhury, J., & Steer, C. (1999). Correction of the UDPglucuronosyltransferase gene defect in the Gunn rat model of Crigler-Najjar syndrome type I with a chimeric oligonucleotide. *Proceedings of the National Academy Science of the USA*, 96, pp. 10349–10354.
- LECHAPT-ZALCMAN, E., AUTHIER, F., CREANGE, A., VOISIN, M., & GHERARDI, R. (1999). LABIAL SALIVARY GLAND BIOPSY FOR DIAGNOSIS OF AMYLOID POLYNEUROPATHY. *Muscle Nerve*, 22, pp. 105–107.
- Levine, R., & Satdtman, E. (1996). Protein modifications with aging. In E. Schneider, & J. R. (Eds), *Handbook of the biology of aging* (pp. 184-197). London:Academic Press.
- Li, Y., Elashoff, D., & Oh, M. (2006). Serum circulating human mRNA profiling and its utility for oral cancer detection. *Journal of Clinical Oncology*, 24(11), pp. 1754-1760.
- Lim, A., Prokaeva, T., McComb, M., O'Connor, P., Theberge, R., Connors, L., et al. (2002). Characterization of transthyretin variants in familial transthyretin amyloidosis by mass spectrometric peptide mapping and DNA sequence analysis. *Analytical Chemistry*, 74, pp. 741-751.
- Lobato, L. (2006). Classificação das Amiloidoses. *Sinapse*, 6, pp. 68-73.
- Lobato, L. G. (1998). In R. G. Kyle, *Amyloid and Amyloidosis* (p. 270). Parthenon Publishing.
- Luís, M. (2006). Polineuropatia Amiloidótica Familiar do Tipo Português: do artigo original ao futuro. *Sinapse*, 6, pp. 40-42.
- Luthra, M., & Balasubramanian, D. (1993). Nonenzymatic Glycation Alters Protein Structure and Stability: A STUDY OF TWO EYE LENS CRYSTALLINS. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 268, pp. 18119-18127.
- Macedo, B., Batista, A., do Amaral, J., & Saraiva, M. (2007). Biomarkers in the Assessment of Therapies for Familial. *Molecular Medicine*, 13, pp. 584-591.
- Matsunaga, N., Anan, I., Rosenberg, P., Ando, Y., & Suhr, O. B. (2002). Advanced Glycation end products (AGE) and the receptor for AGE are present in familial amyloidotic polyneuropathy patients' gastrointestinal tract but do not induce NF-κB activation. *The 5th International Symposium on Familial Amyloidotic Polyneuropathy and Other Transthyretin Related Disorders*, 1, p. 9.
- Matsunaga, N., Anan, I., Rosenberg, P., Nagai, R., Horiushi, S., Ando, Y., et al. (2002). The role of RAGE and AGE on kidney failure in patients with familial amyloid polyneuropathy. *The 5th International Symposium on Familial Amyloidotic Polyneuropathy and Other Transthyretin Related Disorders*, 1, p. 8.

- Melhus, H., Nilsson, T., Peterson, P., & Rask, L. (1991). Retinol binding protein and transthyretin expressed in HeLa cells form a complex in the endoplasmic reticulum in both the absence and presence of retinol. *Experimental Cell Research*, 197, pp. 119-124.
- Mello, A. (1959). Polineuropatia amiloidótica familiar. *Jornal Brasileiro Medicina*, 1, pp. 161-218.
- Meretoja, J. (1973). Genetics aspects of familial amyloidosis with corneal lenticle dystrophy and cranial neuropathy. *Clinical Genetics*, 4, pp. 173-185.
- Mikami, F., Ando, Y., Imasato, A., Tajiri, T., Sato, T., Shuto, T., et al. (2002). Transthyretin amyloidogenesis altered by Cr³⁺ and Al³⁺. *5th International Symposium on Familial Amyloidotic Polyneuropathy and Other Transthyretin Related Disorders I-P-04*.
- Miller, S. (1994). Saliva testing: a nontraditional diagnostic tool. *Clinical Laboratory and Science*, 7(1), pp. 39-44.
- Monteiro, F., Sousa, M., Cardoso, I., do Amaral, J., Guimaraes, A., & Saraiva, M. (2006). Activation of ERK1/2 MAP kinases in familial amyloidotic polyneuropathy. *Journal of Neurochemistry*, 97, pp. 151-161.
- Munar-Quès, M., Costa, P., & Saraiva, M. (1988). FAP type I (Portuguese form) in the island of Mallorca (Spain)-study of five families. *Bol Hosp I (HGSA, Porto)*, 3 (9), pp. 17-27.
- Nemet, I., Varga-Defterdarovic, L., & Turk, Z. (2006). Methylglyoxal in food and living organisms. *Molecular Nutrition and Food Research*, 50, pp. 1105 – 1117.
- Ng, D., Koh, D., Choo, S., & Chia, K. (2006). Saliva as a viable alternative source of human genomic DNA in genetic epidemiology. *Clinica Chimica Acta*, 367(1-2), pp. 81-85.
- O'Connell, K., Martens, J., & Tamkun, M. (2004). Localization of ion channels to lipid raft domains within the cardiovascular system. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 14, pp. 37-42.
- Pardo Mindán, F. (1996). Inmunopatología. In F. Pardo, *Anatomía Patológica* (p. 271). Harcourt.
- Pedersen, A., Bardow, A., & Nauntofte, B. (2005). Salivary changes and dental caries as potential oral markers of autoimmune salivary gland dysfunction in primary Sjögren's syndrome. *BMC Clinical Pathology*, 5(1), p. 4.
- Pinho e Costa, P. (2006). Diagnóstico Molecular da Polineuropatia Amiloidótica Familiar. *Sinapse*, 6, pp. 138-142.
- Pink, R., Simek, J., Vondrakova, J., Faber, E., Michl, P., Pazdera, J., et al. (2009). Saliva as diagnostic medium. *Biomedical Papers of Medicine Faculty of University of Palacky Olomouc Czech Republic*, 153 (2), pp. 103-110.
- Propsting, M., Blaschke, M., Haas, R., Genschel, J., Hedrich, H., Manns, M., et al. (1999). Inosine(15.1)-hammerhead ribozymes for targeting the transthyretin-30 mutation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 260, pp. 313-317.

V. Referências

- Quintas, A., Vaz, D., Cardoso, I., Saraiva, M., & Brito, R. (2001). Tetramer dissociation and monomer partial unfolding precedes protofibril formation in amyloidogenic transthyretin variants. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, pp. 27207-27213.
- Raz, A. (1969). The interaction of thyroxine with human plasma prealbumin and with the prealbumin-retinol-binding protein complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 244, pp. 3230-3237.
- Regnault, V., Costa, P., Teixeira, A., Rivat, C., Stoltz, J., Saraiva, M., et al. (1992). Specific removal of transthyretin from plasma of patients with familial amyloidotic polyneuropathy: optimization of an immunoadsorption procedure. *The International Journal of Artificial Organs*, 15, pp. 249-255.
- Reilly, M., Adams, D., Davis, M., Said, G., & Harding, A. (1995). Haplotype analysis of French, British and other European patients with familial amyloid polyneuropathy (MET30 and TYR77). *Journal of Neurology*, 242, pp. 664-668.
- Reixach, N., Deechongkit, S., Jiang, X., Kelly, J., & Buxbaum, J. (2004). Tissue damage in the amyloidoses: transthyretin monomers and nonnative oligomers are the major cytotoxic species in tissue culture. *Proceedings of the National Academy of Science*, 101, pp. 2817-2822.
- Ribeiro Rosário, M., Antunes, L., & Barros, F. (1961). Contribuição para o estudo clínico e laboratorial da paramiloidose de Corino de Andrade. *Jornal da Sociedade de Ciencias Médicas*, 75, pp. 1-46.
- Roche Applied Sciences. (2005). BM Chemiluminescence Western Blotting Kit (Mouse/Rabbit) instructions.
- Rukavina, J., Block, W., Jackson, C., Falls, H., Carey, J., & Curtis, A. (1956). Primary systemic amyloidosis. A review and an experimental, genetic and clinical study of 29 cases with particular emphasis on the familial form. *Medicine (Baltimore)*, 35, pp. 239-334.
- Salvi, F., Salvi, G., Volpe, R., Mencucci, R., Plasmati, R., Michelucci, R., et al. (1993). Transthyretin-related TTR hereditary amyloidosis of the vitreous body. Clinical and molecular characterization in two Italian families. *Ophthalmic Paediatrics and Genetics*, 14, pp. 9-16.
- Samadani, U., & Costa, R. (1996). The transcriptional activators hepatocyte nuclear factor 6 regulates liver gene expression. *Molecular Cell Biology*, 16, pp. 6273-6284.
- Saraiva, M., Alves, I., & Costa, P. (1989). A simplified method for screening populations at risk in transthyretin Met-30 associated familial amyloidotic polyneuropathy. *Clinical Chemistry*, 35, pp. 1033-1035.
- Saraiva, M., Melhus, H., Rego, K., Costa, P., & Goodman, D. (1985). Genetic studies on a human plasma transthyretin (prealbumin) variant associated with familial amyloidotic polyneuropathy. In P. H. (ed.), *Protides of the Biological Fluids* (Vol. 33, pp. 127-130). Pergamon Press.

- Saraiva, M., Sherman, W., Marboe, C., Figueira, A., Costa, P., de Freitas, A., et al. (1990). Cardiac amyloidosis: report of a patient heterozygous for the transthyretin isoleucine 122 variant. *Scandinavian Journal of Immunology*, 32, pp. 341-346.
- Sawabe, M., Hamamatsu, A., Ito, T., Arai, T., Ishikawa, K., Chida, K., et al. (2003). Early pathogenesis of cardiac amyloid deposition in senile systemic amyloidosis: close relationship between amyloid deposits and the basement membranes of myocardial cells. *Virchows Arch*, 442, pp. 252-257.
- Schreiber, G., Tsykin, A., Aldred, A., Thomas, T., Fung, W., Dickson, P., et al. (1989). The acute phase response in rodent. *Annals of the N. Y. Academy of Science*, 557, pp. 61-85.
- Schuchardt, S., & Sickmann, A. (2007). Protein identification using mass spectrometry: A method overview. *Plant Systems Biology*, pp. 141-170.
- Sebastiao, M., Merlini, G., Saraiva, M., & Damas, A. (2000). The molecular interaction of 4'-iodo-4'-deoxydoxorubicin with Leu55Pro transthyretin "amyloid-like" oligomer leading to disaggregation. *The Biochemical Journal*, 351, pp. 273-279.
- Serpell, L., Goldstein, G., Dacklin, I., Lundgren, E., & Blake, C. (1996). The "edge strand" hypothesis: prediction and test of a mutational 'hot-spot' on the transthyretin molecule associated with FAP amyloidogenesis. *Amyloid*, 3, pp. 75-85.
- Shirtcliff, E., & Marrocco, R. (2003). Salivary cotinine levels in human tobacco smokers predict the attentional validity effect size during smoking abstinence. *Psychopharmacology*, 166(1), pp. 11-18.
- Shori, D. K., Kariyawasam, H. H., Knight, R. A., Hodson, M. E., & al, e. (2001). Sulphation of the salivary mucin MG1 (MUC-5B) is not correlated to the degree of its sialylation and is unaffected by cystic fibrosis. *Pflugers Archiv*, 443, pp. S50-S54.
- Snow, C., Senior, A., & Gerace, L. (1987). Monoclonal antibodies identify a group of nuclear pore complex glycoproteins. *The Journal of Cell Biology*, 104, pp. 1143-1156.
- Soares, M., Coelho, T., Sousa, A., Holmgren, G., Saraiva, M., Kastner, D., et al. (2004). Haplotypes and DNA sequence variation within and surrounding the transthyretin gene: genotype-phenotype correlations in familial amyloid polyneuropathy (V30M) in Portugal and Sweden. *European Journal of Human Genetics*, 12, pp. 225-237.
- Sousa, A., Andersson, R., Drugge, U., Holmgren, G., & Sandgren, O. (1993). Familial amyloidotic polyneuropathy in Sweden: geographical distribution, age of onset, and prevalence. *Human Heredity*, 43, pp. 288-294.
- Sousa, A., Coelho, T., Barros, J., & Sequeiros, J. (1995). Genetic epidemiology of familial amyloidotic polyneuropathy (FAP)-Type I in Povoá do Varzim and Vila do Conde (North of Portugal). *American Journal of Human Genetics (Neuropsychiatric Genetics)*, 60, pp. 512-521.

V. Referências

- Sousa, M. M., Yan, S. D., Stern, D., & Saraiva, M. J. (2000). Interaction of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) with transthyretin triggers nuclear transcription factor kB (NF-kB) activation. *Laboratory Investigation*, 80, pp. 1101-1110.
- Sousa, M., & Saraiva, M. (2003). Neurodegeneration in familial amyloid polyneuropathy: from pathology to molecular signaling. *Progress in Neurobiology*, 71, pp. 385-400.
- Sousa, M., Cardoso, I., Fernandes, R., Guimaraes, A., & Saraiva, M. (2001 a). Deposition of transthyretin in early stages of familial amyloidotic polyneuropathy: evidence for toxicity of nonfibrillar aggregates. *The American Journal of Pathology*, 159, pp. 1993-2000.
- Sousa, M., do Amaral, J., Guimarães, A., & Saraiva, M. (2004). Up-regulation of the extracellular matrix remodeling genes, biglycan, neutrophil gelatinase-associated lipocalin and matrix metalloproteinase-9 in familial amyloid polyneuropathy. *The FASEB Journal*.
- Sousa, M., do Amaral, J., Guimaraes, A., & Saraiva, M. (2005). Upregulation of the extracellular matrix remodeling genes, biglycan, neutrophil gelatinase-associated lipocalin, and matrix metalloproteinase-9 in familial amyloid polyneuropathy. *FASEB Journal*, 19, pp. 124-126.
- Sousa, M., Du Yan, S., Fernandes, R., Guimaraes, A., Stern, D., & Saraiva, M. (2001 b). Familial amyloid polyneuropathy: receptor for advanced glycation end products-dependent triggering of neuronal inflammatory and apoptotic pathways. *Journal of Neurosciences*, 21, pp. 7576-7586.
- Svensen, I., Steensgaard-Hansen, F., & Nordvag, B. (1998). A clinical, echocardiographic and genetic characterization of a Danish kindred with familial amyloid transthyretin methionine 111 linked cardiomyopathy. *European Heart Journal*, 19, pp. 782-789.
- Tabak, L. (2001). A revolution in biomedical assessment: the development of salivary diagnostics. *Journal of Dental Education*, 65(12), pp. 1335-1339.
- Tachibana, N., Tokuda, T., Yoshida, K., Taketomi, T., Nakazato, M., Li, Y., et al. (1999). Usefulness of MALDI/TOF mass spectrometry of immunoprecipitated serum variant transthyretin in the diagnosis of familial amyloid polyneuropathy. *Amyloid*, 6, pp. 282-288.
- Takei, Y., Ikeda, S., Ikegami, T., Hashikura, Y., Miyagawa, S., & Ando, Y. (2005). Ten years of experience with liver transplantation for familial amyloid polyneuropathy in Japan: outcomes of living donor liver transplantations. *Internal Medicine*, 44 (11), pp. 1151-6.
- Teixeira, P., Cerca, F., Santos, S., & Saraiva, M. (2006). Endoplasmic reticulum stress associated with extracellular aggregates. Evidence from transthyretin deposition in familial amyloid polyneuropathy. *The Journal of Biological Chemistry*, 281, pp. 21998-22003.
- Terazaki, H., Ando, Y., Misumi, S., Nakamura, M., Ando, E., Matsunaga, N., et al. (1999). A novel compound heterozygote (FAP ATTR Arg104His/ATTR Val30Met) with high serum transthyretin (TTR) and retinol binding protein (RBP) levels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 264, pp. 365-370.

- Thylen, C., Wahlqvist, J., Haettner, E., Sandgren, O., Holmgren, G., & Lundgren, E. (1993). Modifications of transthyretin in amyloid fibrils: analysis of amyloid from homozygous and heterozygous individuals with the Met30 mutation. *EMBO Journal* , 12, pp. 743-748.
- Tokuda, T., Kondo, T., Hanaoka, N., Takei, Y., Kametani, F., Yamada, Y., et al. (1998). A selective transthyretin-adsorption column for the treatment of patients with familial amyloid polyneuropathy. *Amyloid* , 5, pp. 111–116.
- Torres, M., Almeida, M., & Saraiva, M. (1994). TTR exon scanning by nonradioactive duplex SSCPs. In R. Kisilewsky, & M. Benson, *Amyloid and Amyloidosis* (p. 453). New York: Parthenon Publishing.
- Tsuzuki, T., Mita, S., Maeda, S., & Shimada, K. (1985). Structure of the prealbumin gene. *The Journal of Biological Chemistry* , 260, pp. 12224-12227.
- Van Allen, M., Frohlich, J., & Dairs, J. (1969). Inherited predisposition to generalized amyloidosis. *Neurology (Minneapolis)* , 19, pp. 10-25.
- Van Jaarsveld, P., Branch, W., & Robbins, J. (The Journal of Biological Chemistry). Polymorphism of Rhesus monkey serum prealbumin. 1973 , 248, pp. 7898-7903.
- White, J., & Kelly, J. (2001). Support for the multigenic hypothesis of amyloidosis: the binding stoichiometry of retinol-binding protein, vitamin A, and thyroid hormone influences transthyretin amyloidogenicity in vitro. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* , 98, pp. 13019-13024.
- Whitehead, A., Skinner, M., Bruns, G., Costello, W., Edge, M., Cohen, A., et al. (1984). Cloning of human prealbumin complementary DNA. Localization of the gene to chromosome 18 and detection of a variant prealbumin allele in a family with familial amyloidotic polyneuropathy. *Molecular Biology and Medicine* , 2, pp. 411-423.
- Wisniewski, H., & Wegiel, J. (1994). b-Amyloid formation by myocytes of leptomeningeal vessels. *Acta Neuropathologica* , 87, pp. 233-241.
- Wong, D. (2006). Salivary diagnostics powered by nanotechnologies, proteomics and genomics. *JADA* , 137, pp. 313-321.
- Xiang, Y., Cole-Strauss, A., Yoon, K., Gryn, J., & Kmiec, E. (1997). Targeted gene conversion in a mammalian CD34+-enriched cell population using a chimeric RNA/DNA oligonucleotide. *Journal of Molecular Medicine* , 75, pp. 829–835.
- Yan, W., Apweiler, R., Balgley, B., Boontheung, P., Bundy, J., Cargile, B., et al. (2009). Systematic comparison of the human saliva and plasma proteomes. *Proteomics Clinical Applications* , 3, pp. 116–134.

V. Referências

Yoshioka, K., Furuya, H., Sasaki, H., Saraiva, M., Costa, P., & Sakaki, Y. (1989). Haplotype analysis of familial amyloidotic polyneuropathy. Evidence for multiple origins of the Val-Met mutation most common to the disease. *Human Genetics*, 82, pp. 9-13

VI. Anexos

VI. Anexos

1. Soluções

1.1 Electroforesis unidimensional

Tabela VI-8 – Sample Buffer (tampão redutor). (6,25 mM Tris-HCl, pH=6,8; 20% glicerol; 2% SDS, 5% β-mercaptoetanol)	
Reagentes	V (ml)
Água destilada	3
0,5 M Tris-HCl, pH=6,8	1
Glicerol ^M	1,6
10% SDS ^{BR}	1,6
β-mercaptoetanol ^S	6,4
Azul de bromofenol 0,5% (v/v) (in water) ^M	0,4
Volume total	

Tabela VI-9 - Gel de resolução (1 mm) – 12%.		
Reagentes	1 gel (μl)	2 géis (μl)
Água destilada	2175	4350
1,5 M Tris-HCl, pH=8,8	1250	2500
40% Acrilamida Bis ^{BR}	1500	3000
10% SDS	50	100
10% APS ^{BR}	25	50
TEMED ^S	5	10

Tabela VI-10 - Gel de concentração (1 mm ou 1,5 mm) – 4%.		
Reagentes	1 gel (μl)	2 géis (μl)
Água destilada	1590	3180
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	630	1260
40% Acrilamida Bis	250	500
10% SDS	25	50
10% APS	12,5	25
TEMED	5	10

Tabela VI-11- 1,5 M Tris-HCl, pH=8,8.	
Reagentes	Quantidade
Tris base ^{BR}	54,4 g
Água destilada	150 ml
Volume total	300ml

Tabela VI-12- 0,5 M Tris-HCl, pH=6,8.	
Reagentes	Quantidade
Tris base	0,6 g
Água destilada	60 ml
Volume total	100 ml

Tabela VI-13 - Tampão de corrida desnaturante 5x. (1x=25 mM Tris, 192 mM glicina, 0,1% SDS, pH=9,3)	
Reagentes	m (g)
Tris Base	45
Glicina ^{BR}	216
SDS ^S	15
Volume total	3L

1.2 Electroforese bidimensional

Tabela VI-14 - Solução de equilíbrio SDS (guardar em aliquotas de 10 ml a -20 °C).			
Soluções I	Solução II	C_{final}	Quantidade
Ureia ^S	Ureia	6 M	72,1 g
1,5 M Tris HCl, pH=8,8	1,5 M Tris HCl, pH=8,8	75 mM	10 ml
Glicerol 87 % ^M	Glicerol 87 %	29,3% (v/v)	69 ml
SDS 10%	SDS 10%	2% (w/v)	4 g
Azul de bromofenol 1% (w/v)	Bromofenol blue 1%	0,002%	400 µl
Água	Água	-	Até 200 ml
DTT ^S	-	10 g/L	100 mg (por 10 ml)
-	Iodoacetamida ^S	25 g/L	250 mg (por 10 ml)

Tabela VI-15 - Solução de re-hidratação. (guardar em aliquotas de 1 ml a -20 °C)		
Soluções	C_{final}	Quantidade
Ureia	8 M	12 g
CHAPS	2% (w/v)	0,5 g
Azul de bromofenol 1% (w/v)	0,002%	50 µl
IPG Buffer ^{GE}	0,5-2%	10 µl (por 1 ml)
DTT	1%	10 mg (por 1 ml)
Água	-	Até 25 ml

Tabela VI-16 - Gel SDS-PAGE – 12%		
Soluções	1 gel (µl)	2 géis (µl)
Água destilada	17.400	32.000
1,5 M Tris-HCl, pH=8,8	10.000	18.000
40% Acrilamida Bis	12.000	22.000
10% SDS	380	760
10% APS	380	760
TEMED	40	80

Tabela VI-17 - Solução de agarose.		
Solução	C_{final}	Quantidade
Tampão de corrida com SDS 10x	-	10 ml
Agarose	0,5 % (w/v)	0,5 g
Azul de Bromofenol 1% (w/v)	0,002 % (w/v)	200 µl
Água	-	Até 100 ml

1.3 Coloração e descoloração

Tabela VI-18 - Azul coomassie. (0,1% (w/v) coomassie brilliant blue G-205; 50% metanol; 10% ácido acético glacial)	
Reagentes	V (ml)
Azul coomassie G-250 ^S	0,5 g
Metanol ^M	250
Ácido acético glacial ^F	50
Volume total	500

Tabela VI-19 – Descorante. (40% água destilada; 50% metanol; 10% ácido acético glacial)	
Reagentes	V (ml)
Água destilada	200
Metanol	250
Ácido acético glacial	50
Volume total	500

Tabela VI-20 - Plus-One silver staining kit ^{GE} .			
Solução (V _t = 250ml)	Reagentes	Concentração	Quantidade
1. Fixação	metanol	30%	75 ml
	ácido acético glacial	4%	10 ml
2. Sensibilização	metanol	30%	75 ml
	tiosulfato de sódio (5% w/v)	2 g/L	10 ml
	acetato de sódio	68 g/L	17 g
3. Prata	nitrato de prata (2,5% w/v)	2,5 g/L	25 ml
4. Revelação	carbonato de sódio	25 g/L	6,25 g
	formaldeído (37% w/v)	0,296 g/L	200 µl
5. Stop	EDTA.Na ₂ .2H ₂ O	14,6 g/L	3,65 g

1.4 Western-blotting

Tabela VI-21 - Tampão de transferência		
Reagentes	V _t = 250 ml	V _t = 800 ml
	Quantidade	
Tris	1,455 g	4,656 g
Glicina	0,725 g	2,344 g
SDS 10%	0,9375 ml	3 ml
Água	200 ml	640 ml
Metanol	50 ml	160 ml

Tabela VI-22 - Ponceau S		
Reagentes	C _{final}	Quantidade
Ponceau S ^C	0,1 % (w/v)	0,1 g
Ácido acético glacial	2,5%	2,5 ml
Volume total		100 ml

Tabela VI-23 - TBS-Tween 20 (TBS-T), V _t =500 ml.	
Reagentes	Volume
Tween 20 (0,1%) ^S	0,5 ml
TBS 1x	499,5 ml

Tabela VI-24 - TBS, pH=7,5, V _t = 1L	
Reagentes	1x
Tris	6,5 g
NaCl ^{M&B}	8,76 g

1.5 Digestão proteica *in gel*

Tabela VI-25 - 550 mM DTT.	
Reagentes	Quantidade
DTT	0,04242 g
H ₂ O milliQ	500 µl

Tabela VI-26 - 100 mM NH ₄ HCO ₃ .	
Reagentes	Quantidade
NH ₄ HCO ₃ ^S	0,3953 g
H ₂ O MilliQ	50 ml

Tabela VI-27 - 10 mM DTT.	
Reagentes	V (µl)
550 mM DTT	5 µl
100 mM NH ₄ HCO ₃	275 µl

Tabela VI-28 - 110 mM iodoacetamida.	
Reagentes	Quantidade
Iodoacetamida	56 mg
H ₂ O MilliQ	3327 µl

Tabela VI-29 - 55mM iodoacetamida.	
Reagentes	V (µl)
110mM iodoacetamida	250
100mM NH ₄ HCO ₃	250

Tabela VI-30 - 0,1 µg/µl tripsina.	
Reagentes	Quantidade
Tripsina (Promega)	20 µg
HCl 0,001%	200 µl

Tabela VI-31 - 6,7 ng/ µl tripsina	
Reagentes	V (µl)
0,1 µg/µl tripsina	5
50 mM NH ₄ HCO ₃	70

2. Quantificação de proteína total nas amostras de saliva

Tabela VI-32 – Quantificação de proteína total em amostras de saliva total de indivíduos controlo e com PAF.

Absorvância ($\lambda=595$ nm), concentração de proteína total ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) e volume de amostra (μl) utilizado para as experiências de electroforese unidimensional (1D) (40 μg de proteína total), bidimensional (2D) (300 μg ou 40 μg de proteína), correspondente a cada amostra de saliva total de indivíduos PAF não transplantado (PAF NT 12-16) e de indivíduos controlo (C1-7).

<i>Nome da amostra</i>	<i>Abs_{595 nm}</i>	<i>C_{prot total}</i> <i>($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)</i>	<i>V_{40 μg}</i> (μl) <i>(2D)</i>	<i>V_{15 μg}</i> (μl) <i>(1D)</i>	<i>V_{300 μg}</i> (μl) <i>(2D)</i>
PAF NT 12	0,9289	1,051	38,06	14,27	
PAF NT 13	0,8655	0,989	40,44	15,167	303,3367
PAF NT 14	0,6120	0,738	54,20	20,325	406,50407
PAF NT 15	1,1861	1,305	39,10	-	-
PAF NT 16	0,9006	1,023	-	-	229,88506
C1	1,6091	1,723	23,22	8,706	-
C2	0,6398	0,766	-	-	-
C3	0,9823	1,104	36,23		-
C4	0,9823	1,104	36,23	13,587	-
C5	1,6091	1,723	23,22	8,706	174,11
C6	1,7618	1,8734	-	-	160,1
C7	2,2824	2,3874	-	-	125,66

3. Proteínas identificadas por PMF a partir de géis 1D com saliva total de indivíduos controlo (C) e com PAF (P).

Tabela VI-33 – Proteínas identificadas na saliva total de indivíduos controlo e com PAF. Banda, nome das proteínas identificadas na saliva total de indivíduos controlo (C) e PAF (P) na banda correspondente, as suas massas moleculares (MM) reais (teóricas) e experimentais (aparentes) em kDa e o *score* correspondente a cada proteína.

Banda	Nome da proteína	MM aparente	MM teórica	Score	Banda	Nome da proteína	MM aparente	MM teórica	Score
C1	α -sinucleína	178,60	14,46	205	P1	α -amilase 1	204,65	57,77	949
	mucina-5B		590,50	123		α -amilase 2B		57,71	927
	α -amilase 2B		57,71	567		aglutinina salivar		260,74	209
	α -amilase 1		57,77	576		mucina-5B		590,50	133
	cistatina-SN		16,36	186	P2	α -amilase 2B	158,74	57,71	569
C2	α -sinucleína	143,06	14,46	172		α -amilase pancreática		57,71	515
	α -amilase 2B		57,71	741	P3	receptor poli-Ig	103,40	83,28	264
C3	α -sinucleína	124,85	14,46	288		α -amilase 2B		57,71	549
C4	receptor poli-Ig	107,04	83,28	319		α -amilase 1		57,77	540
	α -amilase 2B		57,71	234		α -amilase pancreática		57,71	101
C5	receptor poli-Ig	91,12	83,28	369	P4	receptor poli-Ig	77,57	83,28	181
	α -amilase 2B		57,71	176		α -amilase 2B		57,71	85
C6	α -sinucleína	67,70	14,46	167		α -amilase 1		57,77	76
C7	albumina sérica	64,98	69,37	501	P5	albumina sérica	70,68	69,37	665
	α -sinucleína		14,46	217		cistatina-S		16,21	245
C8	albumina sérica	56,07	69,37	156	P6	região da cadeia C da Ig α -2	62,48	36,53	222
	região da cadeia C da Ig α -1		37,66	131		região da cadeia C da Ig α -1		37,66	221
	região da cadeia C da Ig α -2		36,53	125		albumina sérica		69,37	296
	α -amilase 2B		57,71	184		cistatina-SN		16,36	165
	α -amilase 1		57,77	598		α -amilase 2B		57,71	254
C9	α -amilase 1	50,91	57,77	784/1, 150		α -amilase 2B		57,71	628

VI. Anexos

Tabela VI-33 – Proteínas identificadas na saliva total de indivíduos controlo e com PAF. Banda, nome das proteínas identificadas na saliva total de indivíduos controlo (C) e PAF (P) na banda correspondente, as suas massas moleculares (MM) reais (teóricas) e experimentais (aparentes) em kDa e o *score* correspondente a cada proteína.

Banda	Nome da proteína	MM aparente	MM teórica	Score	Banda	Nome da proteína	MM aparente	MM teórica	Score
	α -amilase 2B		57,71	782	P7	α -amilase 1	52,51	57,77	534
	α -amilase pancreática		57,71	680		albumina sérica		69,37	374
C10	α -amilase 1	46,67	57,77	1,240		região da cadeia C da Ig α -1		37,66	136
	α -amilase 2B		57,71	1,220	P8	α -amilase 1	49,41	57,77	926
C11	região da cadeia C da Ig α -1	43,12	37,66	69		α -amilase 2B		57,71	895
	albumina sérica		69,37	176		albumina sérica		69,37	286
	α -amilase 2B		57,71	285	P9	albumina sérica	45,42	69,37	400
	α -amilase pancreática		57,71	149		α -amilase 2B		57,71	431
	α -amilase 1		57,77	276		região da cadeia C da Ig α -1		37,66	207
	α -sinucleína		14,46	214		região da cadeia C da Ig α -2		36,53	211
	região da cadeia C da Ig α -2		36,53	125		α -amilase 1		57,77	440
C12	actina, citoplásmica 2	38,33	41,79	193	P10	albumina sérica	38,33	69,37	290
	actina, α músculo cardíaco 1		42,02	101		região da cadeia C da Ig α -1		37,66	164
	actina, α músculo esquelético		42,05	100		região da cadeia C da Ig α -2		36,53	161
	α -sinucleína		14,46	125		α -amilase 2B		57,71	618
	actina, citoplásmica 1		41,74	117		α -amilase 1		57,77	609
C13	calgranulina-A	35,96	10,84	167	P11	α -amilase 2B	36,71	57,71	410
	glicoproteína- α -2 de zinco		33,87	167		região da cadeia C da Ig α -1		37,66	156
	α -amilase 2B		57,71	178		α -amilase 1		57,77	111
	α -amilase 1		57,77	178		receptor poli-Ig		83,28	65
	α -amilase pancreática		57,71	164		albumina sérica		69,37	138
C14	anidrase carbónica salivar 6	33,55	35,37	118	P12	α -amilase 1	34,54	57,77	165
	glicoproteína- α -2 de zinco		33,87	129		albumina sérica		69,37	173
	calgranulina-A		10,84	82		região da cadeia C da Ig α -1		37,66	131
C15	α -amilase 2B	29,89	57,71	776		região da cadeia C da Ig α -2		36,53	128
	α -sinucleína		14,46	69		α -amilase 2B		57,71	546

Tabela VI-33 – Proteínas identificadas na saliva total de indivíduos controlo e com PAF. Banda, nome das proteínas identificadas na saliva total de indivíduos controlo (C) e PAF (P) na banda correspondente, as suas massas moleculares (MM) reais (teóricas) e experimentais (aparentes) em kDa e o *score* correspondente a cada proteína.

Banda	Nome da proteína	MM aparente	MM teórica	Score	Banda	Nome da proteína	MM aparente	MM teórica	Score
C16	α -amilase 1	27,82	57,77	539	P13	α -amilase pancreática	32,63	57,71	120
	α -amilase 2B		57,71	530		α -amilase 1		57,77	139
C17	α -amilase 2B	25,66	57,71	264		albumina sérica		69,37	175
	α -amilase 1		57,77	271		região da cadeia C da Ig α -1		37,66	108
C18	α -amilase 1	24,31	57,77	229		α -amilase 2B		57,71	536
	α -amilase 2B		57,71	238		α -amilase pancreática		57,71	166
C19	α -amilase 2B	23,83	57,71	145	P14	α -amilase 2B	27,82	57,71	538
	α -amilase pancreática		57,71	125		região da cadeia C da Ig α -1		37,66	188
C20	região da cadeia C da Ig k	22,00	11,61	94		α -amilase 1		57,77	529
	proteína zimogénio granular 16 (homólogo B)		22,74	118	P15	α -amilase 2B	26,60	57,71	580
C21	proteína zimogénio granular 16 (homólogo B)	20,56	22,74	196		α -amilase 1		57,77	117
	proteína básica salivar rica em prolinas 2		40,80	40	P16	região da cadeia C da Ig α -1	24,96	37,66	106
C22	α -amilase 2B	18,46	57,71	500	P17	α -amilase 2B	24,63	57,71	593
	α -amilase 1		57,77	163		albumina sérica		69,37	218
	α -sinucleína		14,46	135	P18	α -amilase 2B	21,87	57,71	538
	proteína zimogénio granular 16 (homólogo B)		22,74	68		α -amilase 1		57,77	318
	proteína básica salivar rica em prolinas 2		40,80	64		albumina sérica		69,37	162
C23	α -amilase 2B	17,86	57,71	65	P19	α -amilase 2B	19,20	57,71	470
	proteína básica salivar rica em prolinas 2		40,80	50		albumina sérica		69,37	208
C24	lipocalina-1	16,08	19,25	318		α -amilase 1		57,77	470
	α -amilase 2B		57,71	157		região da cadeia C da Ig α -1		37,66	132
	α -amilase 1		57,77	155		glutathione S-transferase P+		23,36	171
	α -amilase pancreática		57,71	137	P20	α -amilase 2B	17,29	57,71	411

VI. Anexos

Tabela VI-33 – Proteínas identificadas na saliva total de indivíduos controlo e com PAF. Banda, nome das proteínas identificadas na saliva total de indivíduos controlo (C) e PAF (P) na banda correspondente, as suas massas moleculares (MM) reais (teóricas) e experimentais (aparentes) em kDa e o *score* correspondente a cada proteína.

Banda	Nome da proteína	MM aparente	MM teórica	Score	Banda	Nome da proteína	MM aparente	MM teórica	Score
	proteína indutível por prolactina		16,57	205		α -amilase 1		57,77	426
	proteína UPF0635 C6orf134		46,81	55		região da cadeia C da Ig k		11,61	105
C25	cistatina-SN	14,42	16,36	537		região da cadeia C da Ig α -1		37,66	234
	α -amilase 2B		57,71	109		região da cadeia C da Ig α -2		36,53	228
	cistatina-S		16,21	252	P21	α -amilase 2B	57,71	417	
	cistatina-SA		16,45	140		α -amilase 1	57,77	425	
C26	cistatina-S	13,72	16,21	247		albumina sérica	69,37	223	
	cistatina-SA		16,45	159		região da cadeia C da Ig α -2	36,53	222	
	cistatina-SN		16,36	194		região da cadeia C da Ig α -1	37,66	275	
C27	cistatina-SN	13,54	16,36	383		glutathione S-transferase P	23,36	126	
	cistatina-S		16,21	370	P22	região da cadeia C da Ig α -1	37,66	269	
	lisozima C		16,54	91		α -amilase 1	57,77	382	
	subunidade α da hemoglobina		15,26	141		albumina sérica	69,37	285	
	cistatina-SA		16,45	119		α -amilase pancreática	57,71	323	
	calgranulina-B		13,24	48		α -amilase 2B	57,71	383	
						P23	região da cadeia C da Ig α -1	15,69	37,66
					α -amilase 2B		57,71		264
					α -amilase 1		57,77		261
					α -amilase pancreática		57,71		234
					albumina sérica		69,37		229
					proteína antagonista do receptor da interleucina-1 +		20,06		91
					P24	região da cadeia C da Ig α -1	14,97	37,66	199
						albumina sérica		69,37	107
						α -amilase 2B		57,71	251
						α -amilase 1		57,77	243

Tabela VI-33 – Proteínas identificadas na saliva total de indivíduos controlo e com PAF. Banda, nome das proteínas identificadas na saliva total de indivíduos controlo (C) e PAF (P) na banda correspondente, as suas massas moleculares (MM) reais (teóricas) e experimentais (aparentes) em kDa e o *score* correspondente a cada proteína.

Banda	Nome da proteína	MM aparente	MM teórica	Score	Banda	Nome da proteína	MM aparente	MM teórica	Score
					P25	α -amilase 1	14,47	57,77	106
						região da cadeia C da Ig α -1		37,66	117
						albumina sérica		69,37	160
						cistatina-B		11,14	279
						proteína de ligação a ácidos gordos, epidermal		15,16	119
						região da cadeia pesada V-III da Ig BRO		13,23	91
						lisozima C		16,54	86
						região da cadeia C da Ig α -2		36,53	118
					P26	região da cadeia C da Ig α -2	14,06	36,53	224
						região da cadeia C da Ig α -1		37,66	223
						cistatina-B		11,14	111
						região da cadeia pesada V-III da Ig BRO		13,23	92
						α -amilase 2B		57,71	148
					P27	região da cadeia pesada V-III da Ig BRO	13,54	13,23	64
						cistatina-B		11,14	75
						cistatina-SN		16,36	288
					P28	cistatina-SN	13,27	16,36	261
						cistatina-B		11,14	163
						ubiquitina		8,57	61
						lisozima C		16,54	65
						albumina sérica		69,37	196
					P29	cistatina-SN	12,68	16,36	109
						cistatina-B		11,14	163
					P30	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase+	12,14	36,05	45
					P31	albumina sérica	11,59	69,37	119

VI. Anexos

Tabela VI-33 – Proteínas identificadas na saliva total de indivíduos controlo e com PAF. Banda, nome das proteínas identificadas na saliva total de indivíduos controlo (C) e PAF (P) na banda correspondente, as suas massas moleculares (MM) reais (teóricas) e experimentais (aparentes) em kDa e o *score* correspondente a cada proteína.

Banda	Nome da proteína	MM aparente	MM teórica	Score	Banda	Nome da proteína	MM aparente	MM teórica	Score
					P32	defensina de neutrofilo 3+	11,09	10,25	103
						albumina sérica		69,37	119

4. Análise dos géis bidimensionais efectuada pelo programa *Samespots*

Cada spot analisado pelo programa e seleccionado com sendo diferente foi analisado estatisticamente e apresentou diferenças estatisticamente significativas.

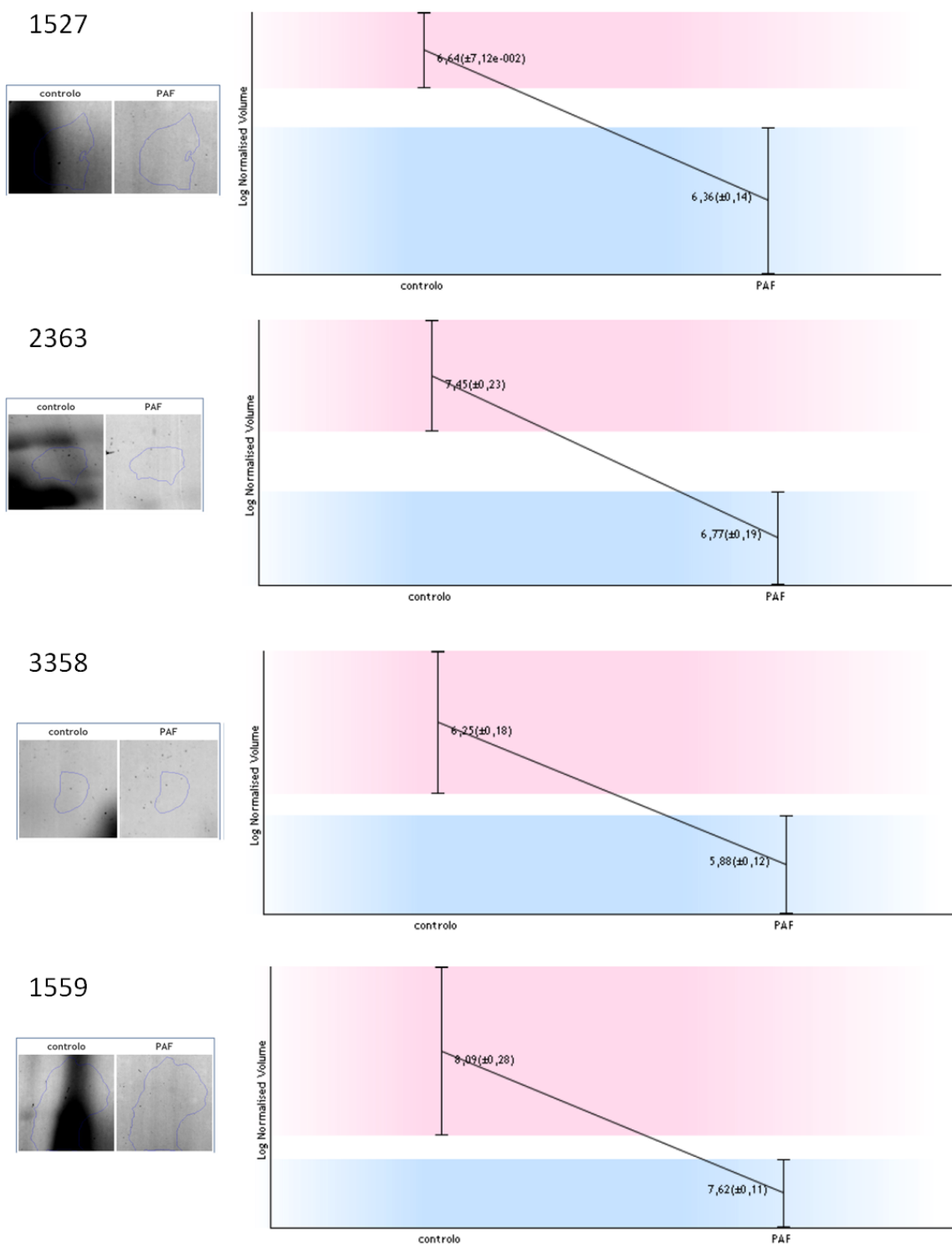


Figura VI-43 – Análise de spots pelo programa Samespots. Spots reconhecidos como diferenciais (esquerda). Logaritmo do volume normalizado do spot escolhido nos géis controlo e PAF (direita).

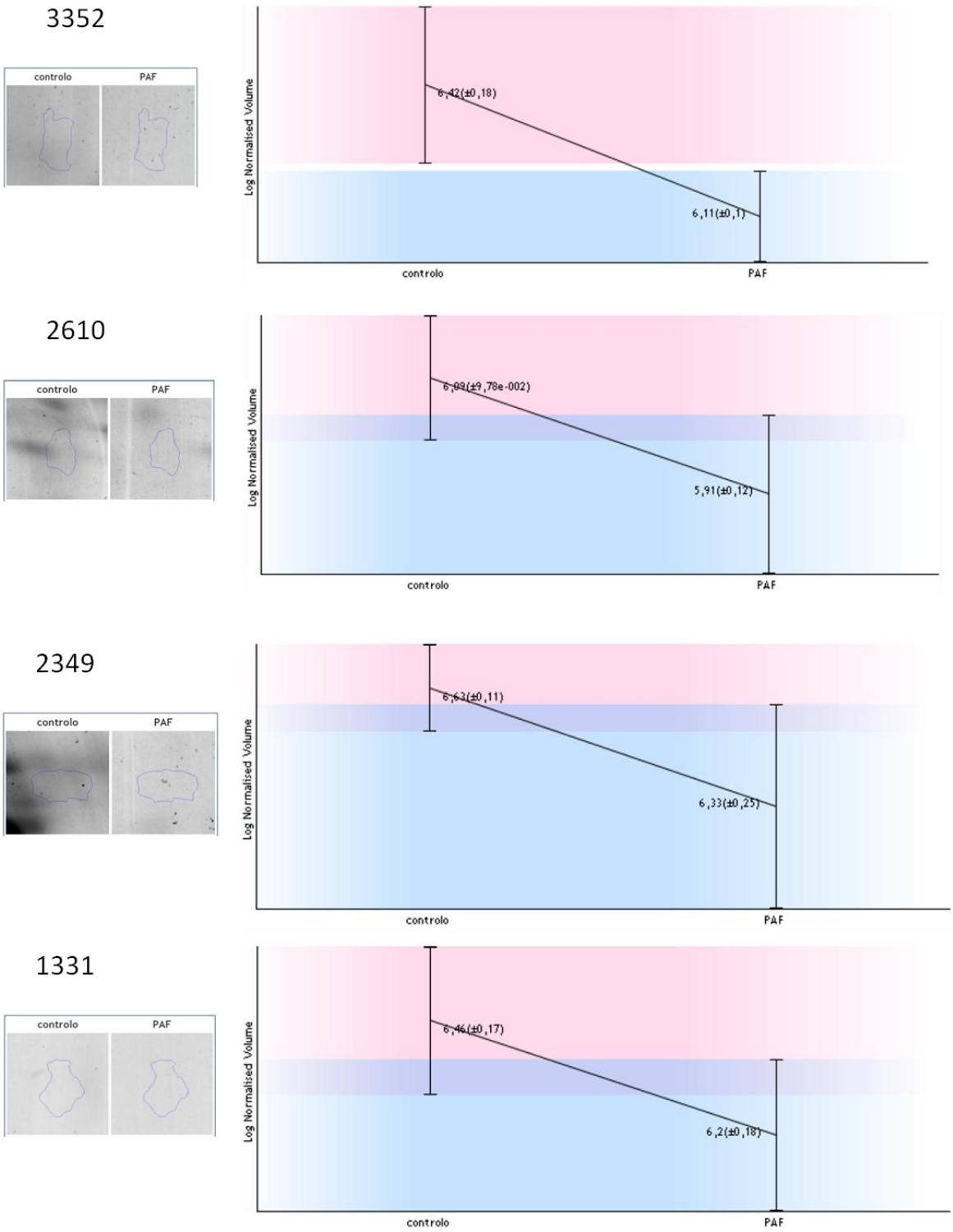


Figura VI- 43– Continuação. Spots reconhecidos como diferenciais (esquerda). Logaritmo do volume normalizado do spot escolhido nos géis controlo e PAF (direita).

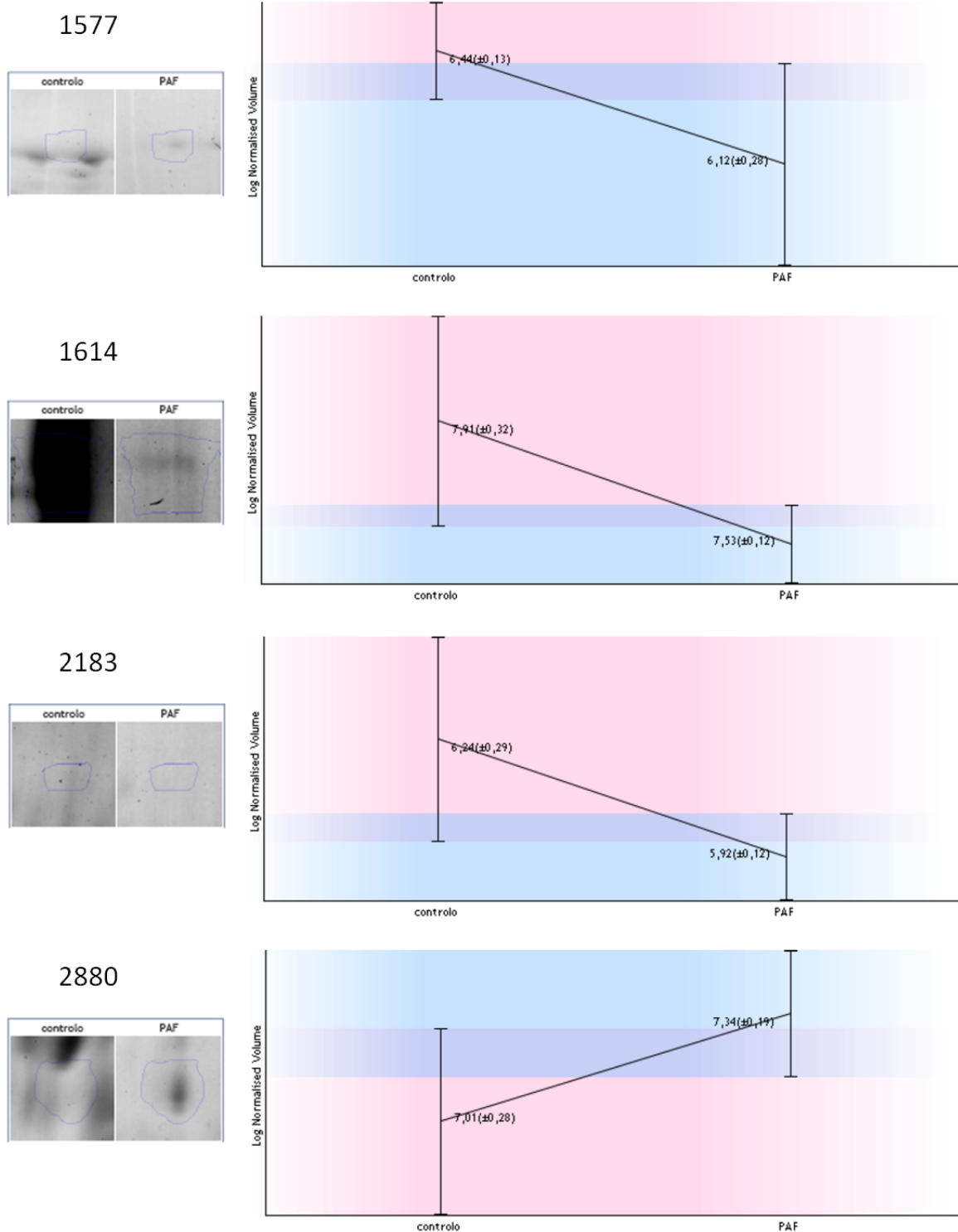


Figura VI- 43– Continuação. Spots reconhecidos como diferenciais (esquerda). Logaritmo do volume normalizado do spot escolhido nos géis controlo e PAF (direita).

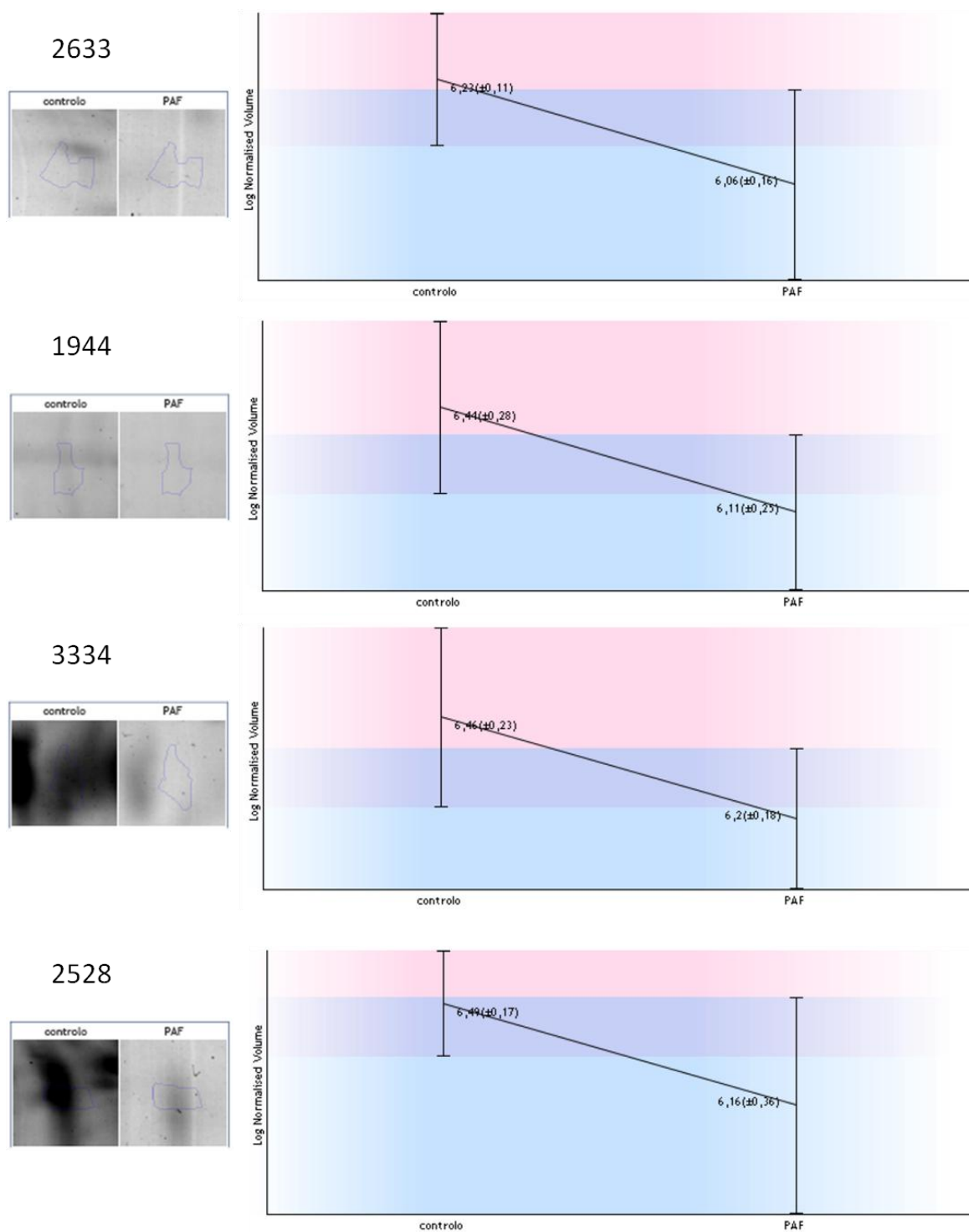


Figura VI- 43– Continuação. Spots reconhecidos como diferenciais (esquerda). Logaritmo do volume normalizado do spot escolhido nos géis controle e PAF (direita).

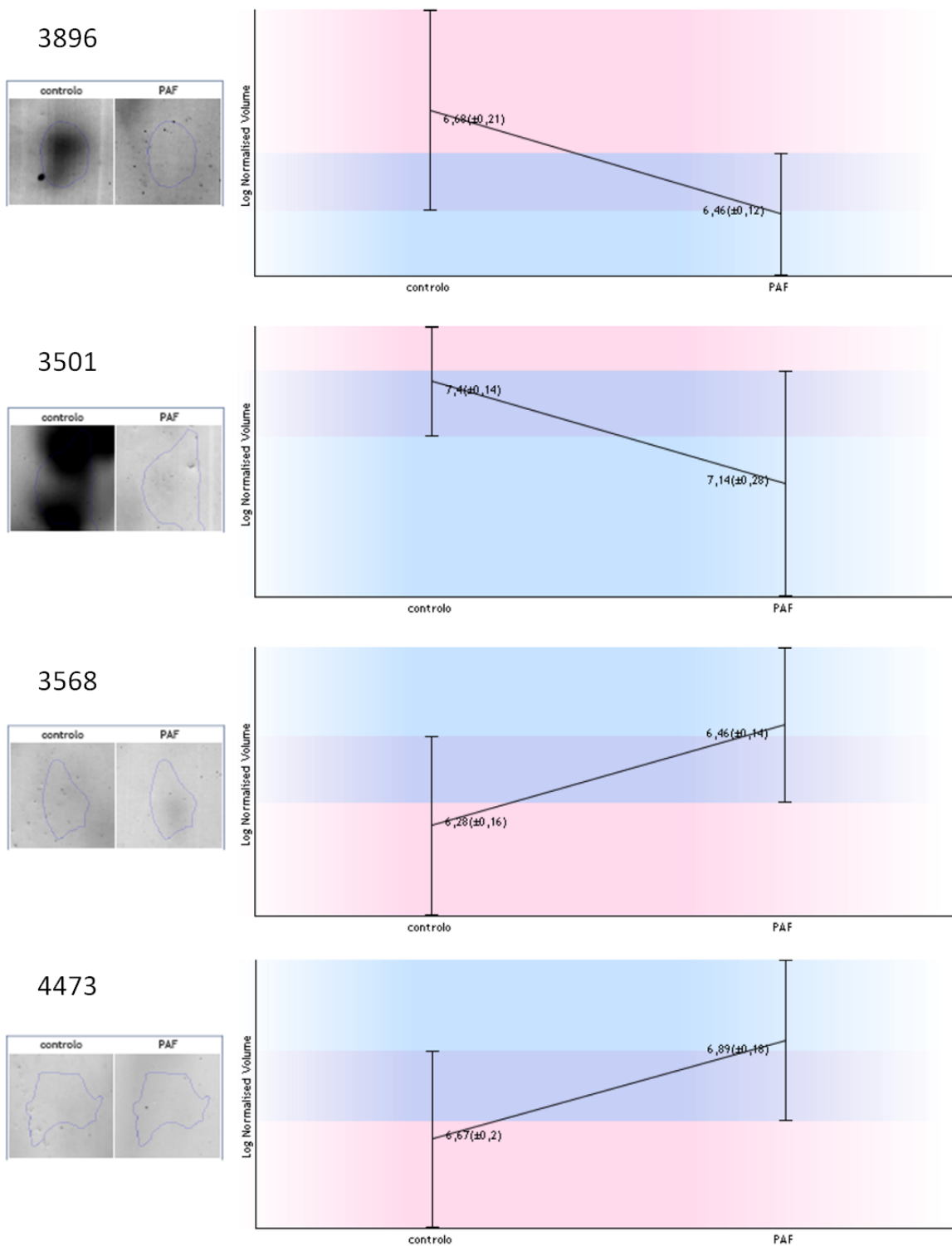


Figura VI- 43– Continuação. Spots reconhecidos como diferenciais (esquerda). Logaritmo do volume normalizado do spot escolhido nos géis controlo e PAF (direita).

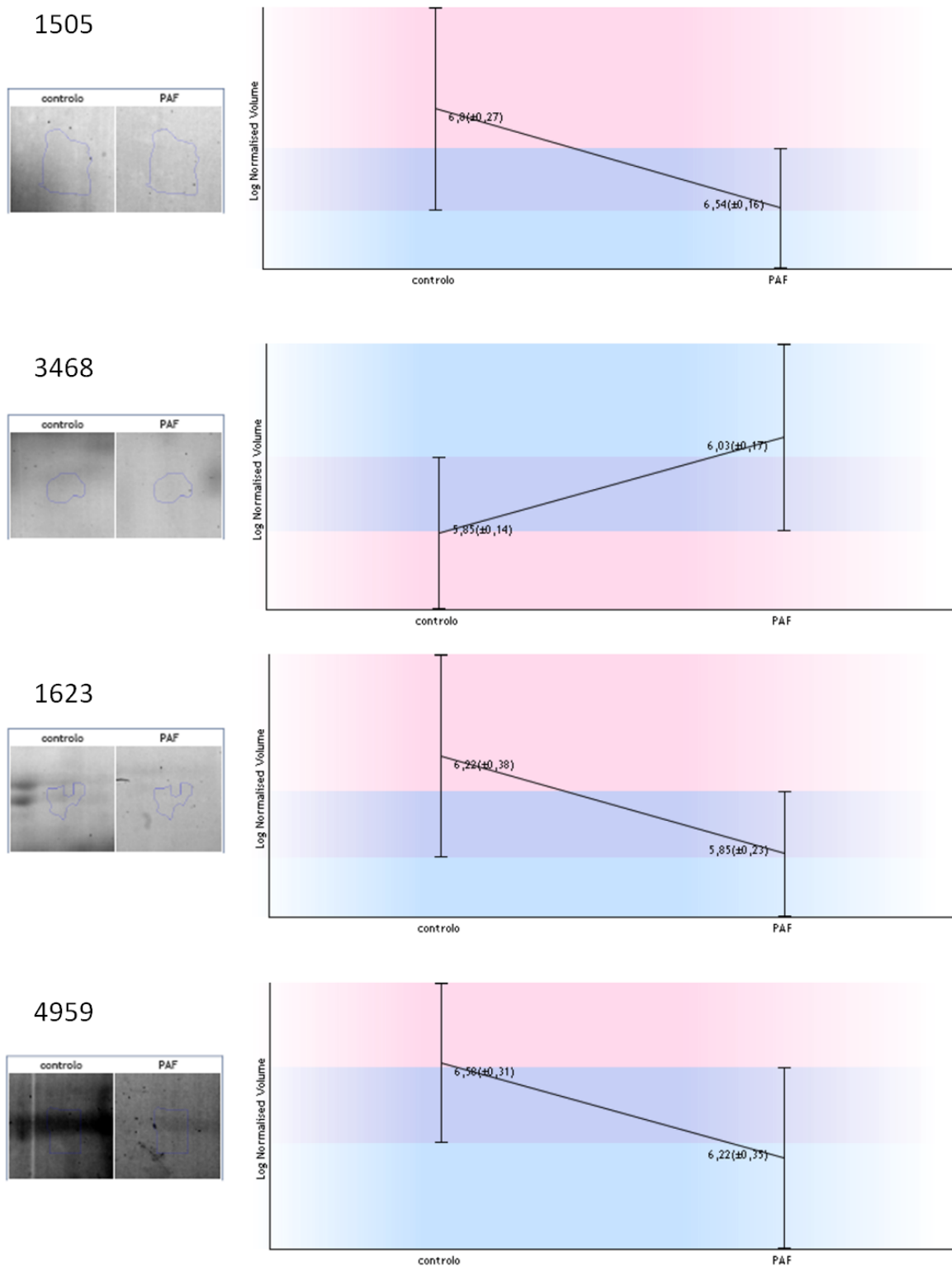
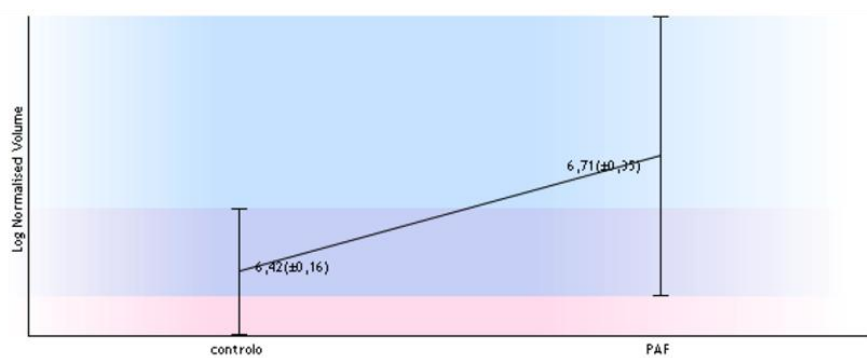
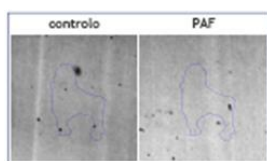
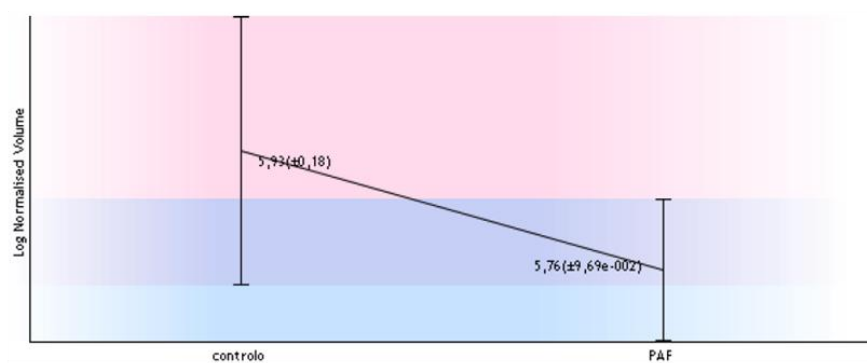
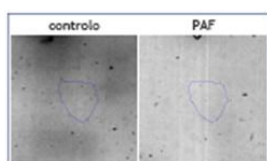


Figura VI- 43– Continuação. Spots reconhecidos como diferenciais (esquerda). Logaritmo do volume normalizado do spot escolhido nos géis controlo e PAF (direita).

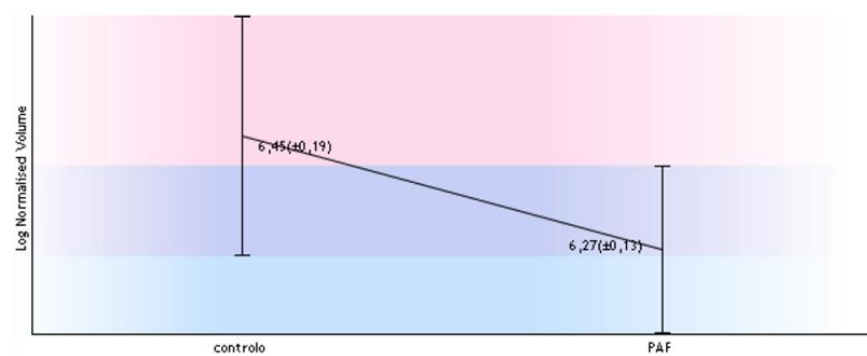
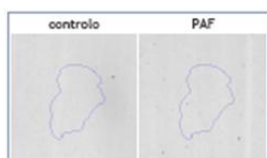
187



3405



1336



2822

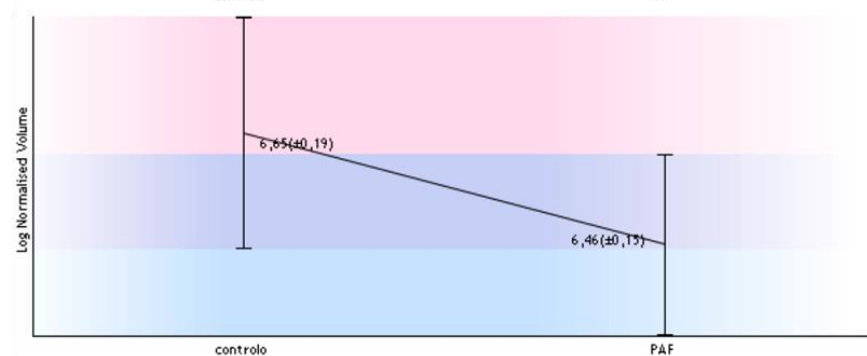
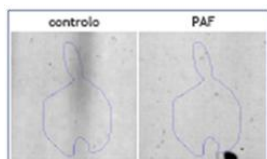


Figura VI- 43– Continuação. Spots reconhecidos como diferenciais (esquerda). Logaritmo do volume normalizado do spot escolhido nos géis controle e PAF (direita).

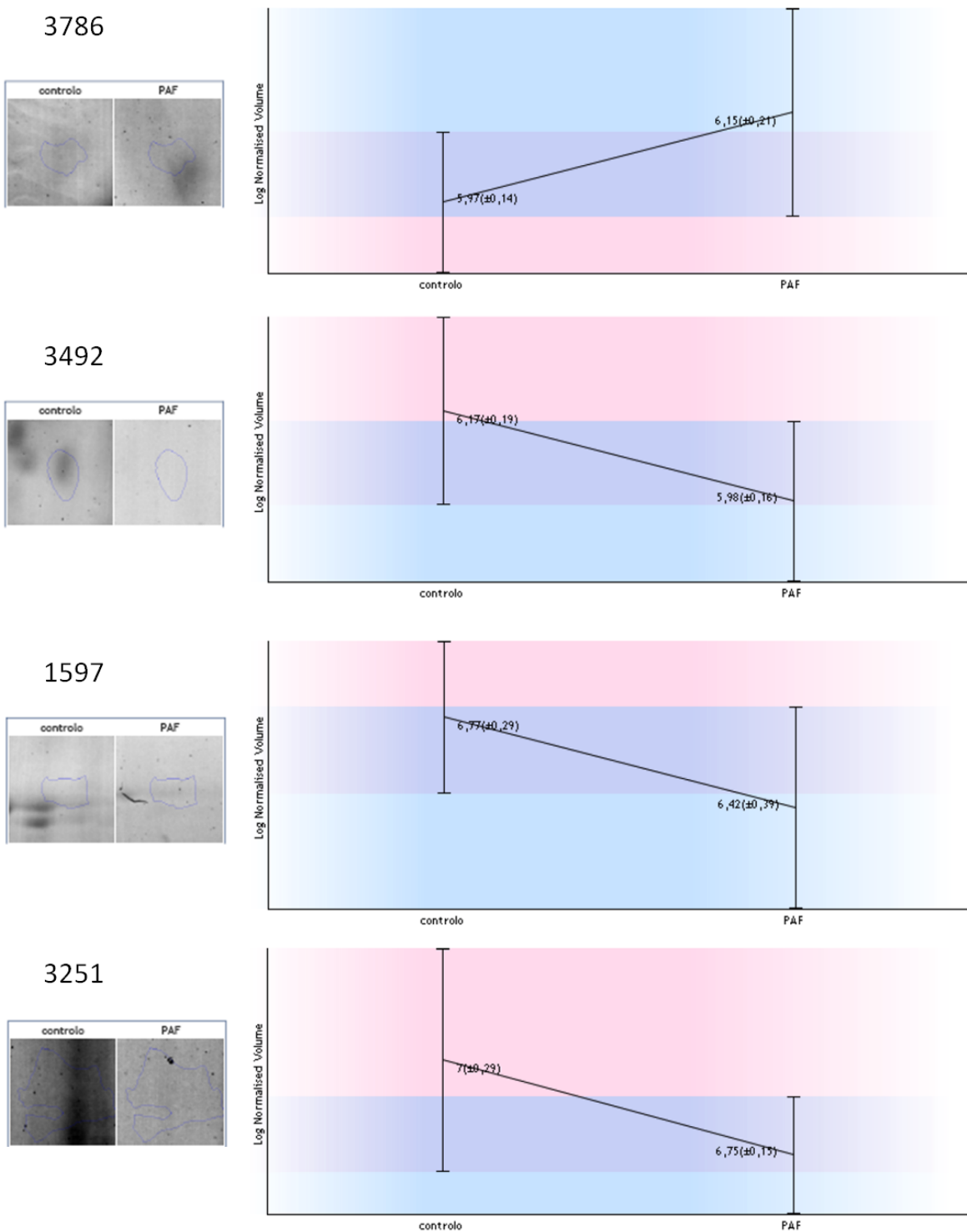


Figura VI- 43– Continuação. Spots reconhecidos como diferenciais (esquerda). Logaritmo do volume normalizado do spot escolhido nos géis controle e PAF (direita).

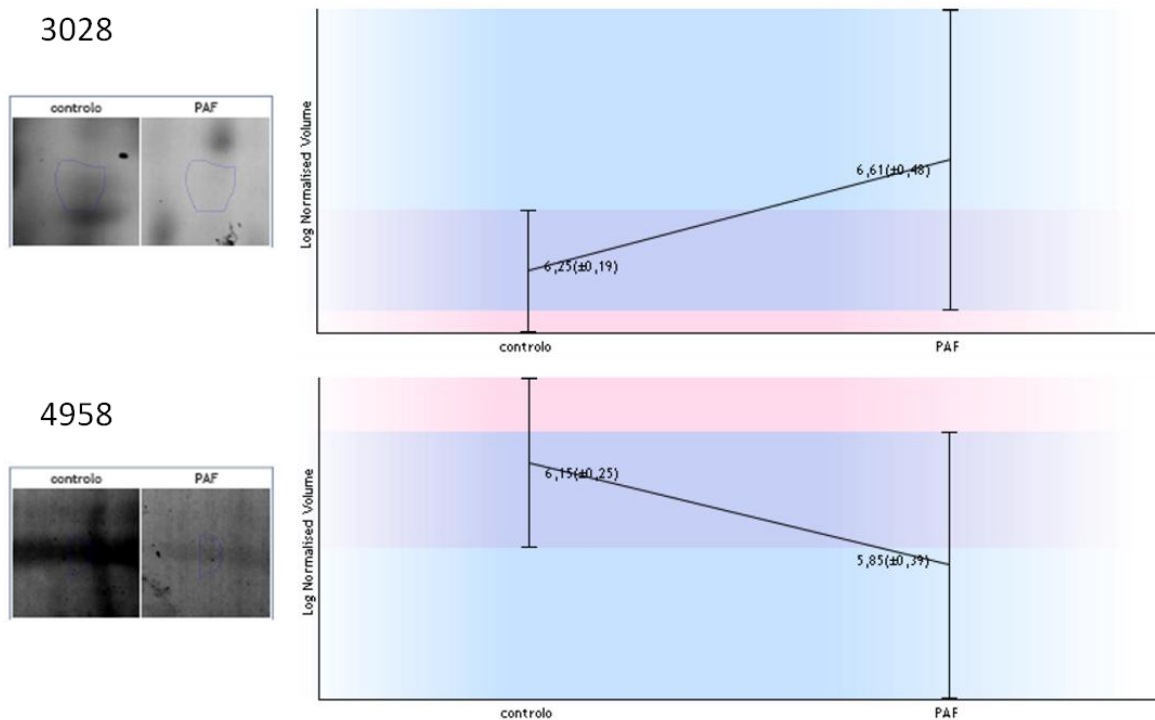


Figura VI-143— Continuação. Spots reconhecidos como diferenciais (esquerda). Logaritmo do volume normalizado do spot escolhido nos géis controlo e PAF (direita).

5. Proteínas expressas diferenciadamente identificadas por PMF a partir de géis 2D com saliva total de indivíduos controlo e com PAF.

Tabela VI-34 – Proteínas expressas diferenciadamente em saliva total de indivíduos controlo e com PAF. Spots com numeração da análise por Samespot, power (p), fold (f), médias dos volumes normalizados (MVN), nome das proteínas identificadas na saliva total de indivíduos controlo (C) e com PAF (P) e o score correspondente a cada proteína.

Spot	p<0,05	f>1,5	MVN		Proteínas identificadas	Score
			C	P		
1527	$7,52 \times 10^{-6}$	4,9	$3,14 \times 10^7$	$6,43 \times 10^6$	-	
2363	$4,19 \times 10^{-5}$	1,9	$4,45 \times 10^6$	$2,37 \times 10^6$	glicoproteína zinco- α -2	473
					actina ciplasmática 2 (gama)	389
					actina ciplasmática 1(beta)	378
					prot tipo β -actina 2	221
3358	$2,26 \times 10^{-4}$	2,4	$1,91 \times 10^6$	$7,90 \times 10^5$	cadeia J - Ig	200
					proteína zimogénio granular 16 (homólogo B)	102
1559	$4,29 \times 10^{-4}$	3,3	$1,42 \times 10^8$	$4,31 \times 10^7$	-	
3352	$7,58 \times 10^{-4}$	2,1	$2,84 \times 10^6$	$1,33 \times 10^6$	receptor polimérico de Ig	119
					proteína zimogénio granular 16 homólogo B	84
2610	0,003	1,5	$1,25 \times 10^6$	$8,33 \times 10^5$	cadeia C - Ig α -1	370
					cadeia C - Ig α -2	353
					glicoproteína zinco- α -2	162
					haptoglobina	53
2349	0,004	1,8	$4,36 \times 10^6$	$2,47 \times 10^6$	glicoproteína zinco- α -2	391
					actina ciplasmática 2 (gama)	350
					actina ciplasmática 1(beta)	339
					prot tipo β -actina 2	231
1331	0,005	1,9	$3,09 \times 10^6$	$1,66 \times 10^6$	albumina sérica	645
					receptor polimérico de Ig	196
1577	0,007	1,8	$2,84 \times 10^6$	$1,55 \times 10^6$	-	
1614	0,007	2,8	$9,84 \times 10^7$	$3,49 \times 10^7$	α -amilase 2B	277
					α -amilase 1	276
					α -amilase pancreática	263
2183	0,008	2,5	$2,14 \times 10^6$	$8,47 \times 10^5$	α -amilase 2B	207
					receptor polimérico de Ig	106
					cadeia C - Ig γ -1	59
					cadeia C - Ig γ -2	39
					cadeia C - Ig γ -3	39
2880	0,013	1,9	$1,20 \times 10^7$	$2,34 \times 10^7$	α -amilase 1	727
					α -amilase 2B	715
2633	0,014	1,5	$1,76 \times 10^6$	$1,20 \times 10^6$	albumina sérica	113
					cadeia C - Ig α -1	99
1944	0,017	2,3	$3,37 \times 10^6$	$1,45 \times 10^6$	α -amilase 2B	486

Tabela VI-34 – Proteínas expressas diferenciadamente em saliva total de indivíduos controlo e com PAF. Spots com numeração da análise por Samespot, power (p), fold (f), médias dos volumes normalizados (MVN), nome das proteínas identificadas na saliva total de indivíduos controlo (C) e com PAF (P) e o score correspondente a cada proteína.

Spot	p<0,05	f>1,5	MVN		Proteínas identificadas	Score
			C	P		
					α-amilase pancreática	424
3334	0,018	1,9	3,27x10 ⁶	1,68x10 ⁶	cadeia C - Ig α-1	355
					cadeia C - Ig α-2	339
					albumina sérica	281
					cadeia C - Ig κ	137
2528	0,018	1,8	3,36x10 ⁶	1,88x10 ⁶	glicoproteína zinco-α-2	535
3896	0,022	1,7	5,26x10 ⁶	3,00x10 ⁶	α-amilase 1	280
					α-amilase 2B	271
3501	0,022	1,6	2,61x10 ⁷	1,65x10 ⁷	cadeia J - Ig	124
3568	0,023	1,5	2,03x10 ⁶	3,03x10 ⁶	-	
4473	0,026	1,6	5,16x10 ⁶	8,24x10 ⁶	isomerase peptidil-prolil cis-trans A	599
1505	0,027	2,1	7,61x10 ⁶	3,66x10 ⁶	-	
3468	0,028	1,5	7,48x10 ⁵	1,13x10 ⁶	cadeia C - Ig α-2	272
					cadeia C - Ig α-1	271
1623	0,031	3,3	2,65x10 ⁶	8,08x10 ⁵	-	
4959	0,031	2,2	4,87x10 ⁶	2,17x10 ⁶	α-amilase 1	371
					α-amilase 2B	361
187	0,032	2,4	2,77x10 ⁶	6,55x10 ⁶	mucina-5B	60
3405	0,037	1,5	9,16x10 ⁵	5,93x10 ⁵	receptor polimérico de Ig	140
					proteína zimogénio granular 16 homólogo B	68
1336	0,038	1,6	3,04x10 ⁶	1,92x10 ⁶	receptor polimérico de Ig	185
2822	0,04	1,6	4,85x10 ⁶	3,04x10 ⁶	receptor polimérico de Ig	144
3786	0,045	1,6	9,81x10 ⁵	1,56x10 ⁶	-	
3492	0,045	1,6	1,62x10 ⁶	1,02x10 ⁶	-	
1597	0,046	2	7,27x10 ⁶	3,73x10 ⁶	albumina sérica	564
3251	0,046	2	1,20x10 ⁷	5,89x10 ⁶	fosfoglicerato cinase 1	125
3028	0,048	3,2	1,97x10 ⁶	6,40x10 ⁶	α-amilase 2B	543
					α-amilase pancreática	443
					cadeia C - Ig α-1	125
					cadeia C - Ig α-2	126

6. Artigos publicados

da Costa, G., Guerreiro, A., Correia, C., Gomes, R., Freire, A., Monteiro, E., et al. (2010). A non-invasive method based on saliva to characterize TTR in FAP patients using FT-ICR high-resolution mass spectrometry. *PROTEOMICS - Clinical Applications*, 4, 674-678.

A NON-INVASIVE METHOD BASED ON SALIVA TO CHARACTERIZE TTR IN PAF PATIENTS USING FT-ICR HIGH-RESOLUTION MASS SPECTROMETRY

SHORT COMMUNICATION

Gonçalo da Costa¹, Ana Guerreiro¹, Catarina F. Correia¹, Ricardo J. Gomes ², Ant3nio Freire³, Estela Monteiro³, Eduardo Barroso³, Ana V. Coelho.^{2,4}, Tiago F. Outeiro⁵, Ana Ponces Freire¹ and Carlos Cordeiro¹.

1 - Departamento de Qu3mica e Bioqu3mica, Centro de Qu3mica e Bioqu3mica, Faculdade de Ci3ncias da Universidade de Lisboa, Edif3cio C8, Lisboa, Portugal

2 – Intituto de T3cnologia Qu3mica e Biol3gica, Oeiras, Portugal

3 – Unidade de Transplanta3o, Hospital Curry Cabral, Lisboa Portugal

4 – Departamento de Qu3mica da Universidade de 3vora, 3vora Portugal

5 – Instituto de Medicina Molecular, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

Keywords: *Transthyretin, Saliva, familial amyloidotic polyneuropathy, systemic amyloidosis, FTICR*

Abbreviations: AL – amyloidosis; ATTR - Transthyretin amyloidosis; FTICR-MS - Fourier transform ion-cyclotron resonance mass spectrometry; FAP - familial amyloid polyneuropathy; V30M - replacement of valine at position 30 by methionine in TTR sequence

Transthyretin amyloidosis (ATTR) is an autosomic dominant degenerative disease characterized by the formation of amyloid fibril deposits, mainly composed of transthyretin, in different organs and tissues [1,2]. These amyloid deposits hinder organ functions and ultimately lead to their failure. The disease is closely related with single amino acid point mutations in transthyretin (TTR), a homotetrameric plasma protein responsible for the transport of thyroxine and retinol, the latter by the association with the retinol-binding protein [3]. The main hypothesis for ATTR pathogenesis is linked to the tetramer instability favoring the

dissociation to non-native monomeric species with the ability to self-associate. These soluble aggregates will evolve to insoluble aggregates and amyloid fibers with the characteristic β -cross sheet structure found in many neurodegenerative diseases like Alzheimer and Parkinson [4]. There are over eighty known TTR point mutations, with a minority being non-amyloidogenic [5]. The most common amyloidogenic point mutation is the replacement of valine at position 30 by methionine, the V30M variant [7]. Carriers of this TTR variant are heterozygous in the large majority of cases and express both wild type TTR and TTR-V30M. Different point mutations

result in distinct clinical prognosis and, since some therapeutic options are incompatible, the correct diagnosis at the earliest stages of the disease progress is crucial.

As plasma TTR is produced in the liver, the only definitive therapy for ATTR is liver transplantation, therefore the detection and relative quantification of TTR variants is essential to evaluate disease prognosis.

Several biological matrices can be used as biomarkers to evaluate patient's health such as blood, umbilical cord blood [8], meconium [9], amniotic fluid [10] and saliva [11]. In comparison to these matrices, saliva has the major advantage of being readily available and can be collected without invasive means. The application of saliva sampling is widely used in pharmaceutical research [12–14] and explored for assessing pesticide exposure [15–19].

For patients, the non invasive collection techniques dramatically reduce anxiety and discomfort and simplify collection of repeated samples for monitoring over time. Saliva is also easier to handle for diagnostic procedures because it does not clot, thus lessening the manipulations required.

Previous studies have described the salivary proteome per se, [20,21] while others described salivary dynamics [5] or the differential abundance in saliva of single factors, such as TTR in the case of type II Diabetes [11].

A universal method, capable to identify and quantify TTR variants in circulation, using a totally non invasive method with a significant higher cost/benefit to the patient would be highly valuable. Taking advantage of the ultra-high resolution provided by Fourier transform ion-cyclotron resonance mass spectrometry (FTICR-MS), peptide mass fingerprint coupled with FTICR-MS was used as a direct method for the identification and relative quantification of TTR variants in the human saliva.

Serum and saliva proteins from control and FAP patients with V30M mutation were analyzed by SDS-PAGE (Figure 1 A and B). In both cases, applying only ten micrograms of protein, which represents around 20 microliters of saliva, is sufficient to distinguish the TTR protein band based only on Coomassie blue staining. Although no significant differences were observed between serum SDS-PAGE protein profiles from control and PAF, we observed that the saliva protein profiles present some differences between these groups. In the future these differences will be exploited to identify putative biomarkers for ATTR development, before symptoms onset. Concerning TTR levels, no differences were observed between control and PAF, as probed by Western blot analysis (Figure 1 C and D).

In contrast with serum, whole saliva is not constant in its composition, because of changes in salivary flow and a differential contribution from the different salivary glands. Thus, to evaluate TTR secretion along the day, saliva was collected from control individuals at different daily time points (Supplementary Figure 1). Although some variations were observed, TTR was always present in detectable amounts in all samples collected. The variability observed did not present a pattern common to all individuals (n=3), being characteristic of each individual. Protein bands corresponding to TTR from serum and saliva of control individuals and FAP patients were excised and digested in gel with trypsin to perform peptide mass fingerprinting. With this analysis we were able to cover at least 60% of TTR sequence (Supplementary Table 1). In both cases no differences were observed in TTR mass spectra from serum and saliva, indicating that the same TTR isoforms are present in both matrices (Figure 2).

The 60% sequence coverage encompasses the amino acid sequences where the vast

majority (more than 90%) of all known amyloidogenic TTR mutations occur, suggesting that an overwhelming majority of different amyloidogenic TTR variants can be unequivocally identified and monitored by this methodology. In fact, we could detect two peptides containing the amino acid 30 which gives a higher confidence in our identification of wild type TTR, as opposite to TTR V30M (Supplementary Table 1). In the control mass spectrum, a peptide with m/z 1366.759, corresponding to the sequence GSPAINVAVHVFR and a peptide with m/z 1494.853 corresponding to the sequence GSPAINVAVHVFRK, which represents a trypsin miss cleavage, are clearly observed.

MALDI mass spectrum of the TTR tryptic map obtained from the serum and saliva of FAP patients with a V30M substitution presents an additional peptide, not observed in the control mass spectrum at m/z 1398.732, corresponding to the 32.056 Da mass shift resulting from the V30M substitution (Figure 2). Hence, this peptide corresponds to the mutant peptide with the sequence GSPAINVAMHVFR, characteristic of the TTR-V30M variant. The presence of a methionine residue in this peptide sequence is further confirmed by the observation of a peak with a 17.002 Da mass increment from the mutant peptide (m/z 1414.726) (Supplementary Table 1), which corresponds to the oxidation of the methionine thioether. We could also observe a third peptide (m/z 1526.826) concerning the same sequence, but with a trypsin miss cleavage (GSPAINVAMHVFRK).

The peptide characteristic of wild-type TTR (1366.759 sequence GSPAINVAVHVFR) is clearly observed in the sample of FAP individuals, as well as the peptide characteristic of V30M TTR variant. This shows, as expected for **heterozygotic** individuals, that FAP patients contain a mixture of wild type and V30M TTR variants

in circulation. These results validate the strategy used to characterize TTR variants in human saliva, using a totally non invasive methodology and opens the possibility to perform a relative quantification of both protein variants. The MS peak height of a single substance in comparison to that of the most similar internal standard can be used to quantify proteins and oligonucleotides [12, 13], peptides [14], oligosaccharides [15], and other low molecular weight compounds [16]. Some reports have been published, which show a linear response of the measured MS peak height ratio to the amount of analyte applied if a proteotypic internal standard is used (e.g., [14, 17, 18, 19]). In this context, the relative intensity of peak with m/z of 1366.759 (wild-type TTR) to a TTR peptide present in all mass spectra acquired (such as peak at m/z of 1394.732, see Table 1) may be used to perform relative quantification of both TTR variants in circulation. This comes from the fact that peak 1394.732 correspond to a peptide that does not contain any mutation so its intensity is a contribution from the two variants. The relative intensity of the peak 1366.759 to the peak 1394.732, is much lower in FAP individuals than in controls (Table 1), indicating that a lower amount of TTR WT is present in the serum of FAP patients. In this way we can perform a relative quantification of these two variants in heterozygous individuals, since the overall quantity of TTR in the serum is similar between control and FAP individuals, as we can observe in the western blot analysis (Figure 1 C and D). This relative quantitation is a significant advantage of this methodology over other methods, given the low amount of sample required.

By comparing the relative intensity of TTR WT and TTR V30M in serum and saliva, we could observe that they are very similar (ratio \approx 1, Table 1). This observation validates the use of saliva to probe TTR levels in circulating TTR.

The current development of diagnostic biomarkers (via proteomic and genomic approaches) in conjunction with technological developments in salivary diagnostics will lead to the development of robust diagnostic tools. To our knowledge this is the first time that TTR detection in human saliva is made both in Control and FAP patients. Using high-resolution mass spectrometry (FTICR-MS). Especially, without any previous enrichment of the proteins by immunoprecipitation it allows the detection in two days or less if using faster methods for protein digestion [20], of TTR variants using only 20 micro liters of saliva. This non invasive methodology will allow the monitoring of TTR levels on FAP and patients after liver transplantation or sequential liver transplantation, with a higher cost/benefit to the patient. Since TTR is ubiquitously present in saliva, samples can be collected at any time of day.

With this method, we estimate that it will be possible to identify and perform relative quantification in heterozygotic subjects in about 90% of all know TTR mutations in saliva.

In the future, the identification of significant changes in saliva proteome composition associated with ATTR may represent potential diagnostic and/or prognostic markers.

References

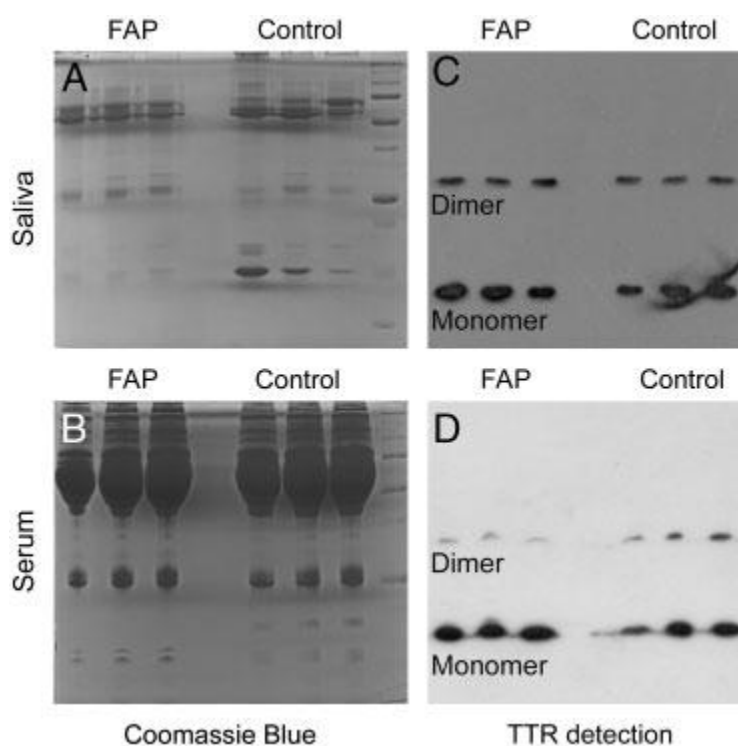
- [1] Andrade C.A peculiar form of peripheral neuropathy; familial atypical generalized amyloidosis with special involvement of the peripheral nerves. *Brain*. 1952, 75(3), 408-27
- [2] Saraiva M.J., Birken S., Costa P.P., and Goodman D.S. Amyloid fibril protein in familial amyloidotic polyneuropathy, Portuguese type. Definition of molecular abnormality in transthyretin (prealbumin). *J Clin Invest*. 1984, 74(1), 104-19.
- [3] Benson M.D. *The Molecular Basis of Inherited Disease, Amyloidosis, Vol III, 7th ed.*; McGraw-Hill: New York. 1995 4159.
- [4] Kelly J.W., Colon W., Lai Z., Lashuel H.A., McCulloch J., McCutchen S.L., Miroy G.J., Peterson S.A. Transthyretin quaternary and tertiary structural changes facilitate misassembly into amyloid. *Adv Protein Chem*. 1997, 50, 161–81.
- [5] Connors L.H., Lim A., Prokaeva T., Roskens V.A., and Costello C.E. Tabulation of human transthyretin (TTR) variants, *Amyloid*. 2003, 10,160-184.
- [6] Westermark P., Sletten K., Johansson B., Cornwell G.G. Fibril in senile systemic amyloidosis is derived from normal transthyretin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990 87 2843–5.
- [7] Saraiva M.J., Costa P.P., Goodman D.S. Studies on plasma transthyretin (prealbumin) in familial amyloidotic polyneuropathy, Portuguese type. *J Lab Clin Med*. 1983, 102(4), 590-603.
- [8] Grosso L.M., Triche E.W., Belanger K., Benowitz NL, Holford T.R., Bracken M.B., Caffeine Metabolites in Umbilical Cord Blood, Cytochrome P-450 1A2 Activity, and Intrauterine Growth Restriction. *American Journal of Epidemiology*. 2006, 163(11), 1035-1041
- [9] Whyatt R.M., Barr D.B. Measurement of organophosphate metabolites in postpartum meconium as a potential biomarker of prenatal exposure: a validation study. *Environ Health Perspect*. 2001 109(4), 417–420.
- [10] A. Petzold A., Stiefel d., Copp A.J. Amniotic fluid brain-specific proteins are biomarkers for spinal cord injury in experimental myelomeningocele. *Journal of Neurochemistry* 2005, 95, 594–598

- [11] Rao P.V., Reddy A.P., Lu X., Dasari S., Krishnaprasad A., Biggs E., Roberts C.T., Nagalla S. Proteomic Identification of Salivary Biomarkers of Type-2 Diabetes, *J. Proteome Res.* 2009, 8 (1), 239–245
- [12] Tang, K., Allman, S. L., Jones, R. B., Chen, C. H. Laser mass spectrometry of oligonucleotides with isomer matrices. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 1993 , 7 (6), 435-9.
- [13] Nelson RW, McLean MA, Hutchens TW, Quantitative Determination of Proteins by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 1994, 66, 1408-1415
- [14] Jespersen S, Niessen WMA, Tjaden UR and van der Greef J, Quantitative bioanalysis in matrixassisted laser desorption ionization/mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 1995, 30: 357-364.
- [15] Harvey, D. J. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of carbohydrates. *Mass Spectrom. Rev.* 1999, 18, 349–451.
- [16] Persson S, Sönksen CP, Frigaard NU, Cox RP, Roepstorff P, Miller M Pigments and proteins in green bacterial chlorosomes studied by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Eur J Biochem.* 2000, 267:450–456
- [17] Hochleitner, E. O., Kastner, B., Fröhlich, T., Schmidt, A, Lührmann R, Arnold G, Lottspeich F. Protein stoichiometry of a multiprotein complex, the human spliceosomal U1 small nuclear ribonucleoprotein: absolute quantification using isotope-coded tags and mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* 2005, 280:2536–2542.
- [18] Zhang, H., Yi, E. C., Li, X., Mallick, P Kelly-Spratt KS, Masselon CD, Camp DG 2nd, Smith RD, Kemp CJ and Aebersold R., High throughput quantitative analysis of serum proteins using glycopeptide capture and liquid chromatography mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics* 2005, 4:144–155.
- [19] Pan, S., Zhang, H., Rush, J., Eng, J. Zhang N, Patterson D, Comb MJ, Aebersold R. High throughput proteome screening for biomarker detection. *Mol. Cell. Proteomics* 2005, 4:182–190.
- [20] Rial-Otero R, Carreira RJ, Cordeiro FM, Moro AJ, Santos HM, Vale G, Moura I, Capelo JL. trasonic assisted protein enzymatic digestion for fast protein identification by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Sonoreactor versus ultrasonic probe. Chromatogr A.* 2007 ,1166(1-2):101-7.

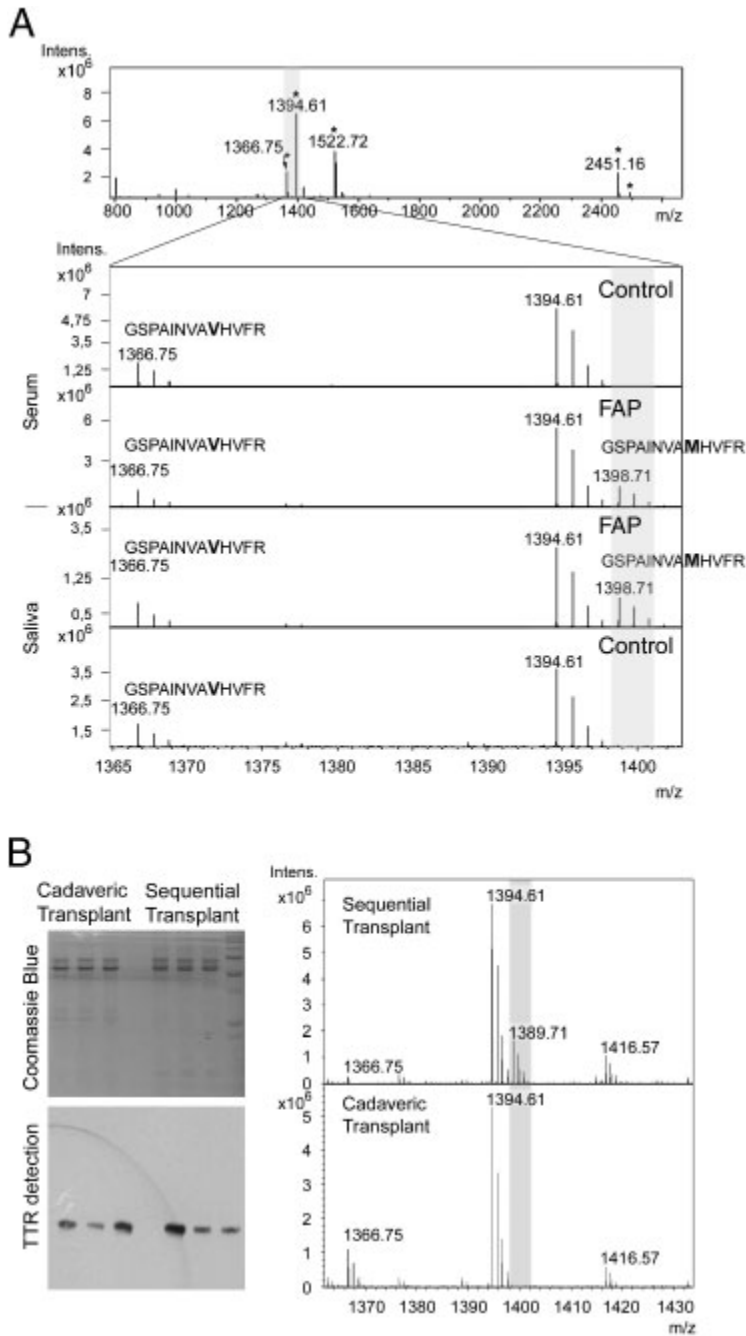
Table 1 – Example of relative quantitation of TTR in serum and saliva from FAP and Control individuals, using peak 1394.732 as internal standard.

	Mass	Control	PAF	Intensity	Ratio	Relative quantity	Ratio serum/Saliva
Serum	1366.76	√		2,20x10 ⁶	0.34	2.42	1.02
	1394.62	√		6,40x10 ⁶			
	1366.76		√	0,80x10 ⁶	0.14		
	1394.62		√	5,85x10 ⁵			
Saliva	1366.76	√		1,60x10 ⁶	0.43	2.38	
	1394.62	√		3,70x10 ⁶			
	1366.76		√	0,80x10 ⁶	0.18		
	1394.62		√	5,85x10 ⁵			

Figures:



1 – SDS-PAGE separation of serum and saliva proteins and Western blot analysis of TTR from three control and three PAF individuals.



2 – Peptide mass Fingerprint of the TTR protein band after tryptic digest from serum and saliva. The ion **1366.759** is present both in control and FAP individuals. This corresponds to the peptide with the sequence GSPAINVAVHVFR. The ion **1398.732** is present only in FAP individuals. This ion corresponds to the peptide with the sequence GSPAINVAMHVFR

da Costa, G., Gomes, R., Guerreiro, A., & Mateus, E. (2010 *submitted*). Looking beyond genetic factors in familial amyloidotic polyneuropathy: protein glycation and chaperone activity loss. *PNAS*.

LOOKING BEYOND GENETIC FACTORS IN FAMILIAL AMYLOIDOTIC POLYNEUROPATHY: PROTEIN GLYCATION AND CHAPERONE ACTIVITY LOSS

Gonçalo da Costa¹, Ricardo J. Gomes², Ana Guerreiro¹, Élia Mateus³, Estela Monteiro³, Eduardo Barroso³, Ana V. Coelho.^{2,4}, Ana Ponces Freire¹ and Carlos Cordeiro¹.

From Centro de Química e Bioquímica, Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Edifício C8, Campo Grande, 1749-016 Lisboa, Portugal ¹, Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Av. da República Estação Agronómica Nacional 2780-157 Oeiras Portugal ², Unidade de Transplantação Hepática, Hospital Curry Cabral, Nossa Senhora de Fátima 1050 Lisboa Portugal ³, Departamento de Química da Universidade de Évora, Colégio Luís Verney Rua Romão Ramalho, 59 7000 Évora, Portugal ⁴.

Address correspondence to: Carlos Cordeiro, Centro de Química e Bioquímica, Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Edifício C8, Campo Grande, 1749-016 Lisboa, Portugal. Tel.: ++351217500929, Fax ++351217500088; e-mail: caac@fc.ul.pt

Familial amyloidotic polyneuropathy (FAP) is a systemic conformational disease where serum transthyretin (TTR) tetramer dissociation, unfolding and aggregation cause extracellular amyloid fiber formation in different organs and tissues. More than 80 TTR point mutations are known to be associated with amyloidotic disease. The most widely accepted model of TTR aggregation and amyloid fiber formation relates tetramer stability with TTR mutations. The more amyloidogenic mutations associated to the most aggressive disease forms are the less stable ones. However, this model fails to explain two observations. First, native TTR also forms amyloid in systemic senile amyloidosis, a geriatric disease. Second, age at disease

onset varies by decades for patients bearing the same mutation and some mutation carrier individuals are asymptomatic throughout their lives. Hence, mutations accelerate the process but non-genetic factors are likely to be involved. One of this factors is protein glycation, associated to other conformational diseases like Alzheimer and Parkinson. We previously discovered that amyloid fibers in FAP are specifically glycosylated by methylglyoxal, giving support to this hypothesis. Here we show that serum proteins are differentially glycosylated by methylglyoxal in FAP patients and that the main glycation target is fibrinogen, also found in this work to interact with TTR. Fibrinogen is a chaperone and we found that upon glycation by

methylglyoxal it loses its chaperone activity. We propose that glycation by methylglyoxal hampers fibrinogen chaperone action, rendering TTR tetramers more prone to dissociation and triggering the molecular pathways of aggregation, amyloid formation and ultimately, disease.

Familial amyloidotic polyneuropathy (FAP) is an autosomic dominant neurodegenerative disease characterized by the formation of amyloid fibril deposits, mainly composed of transthyretin in different organs and tissues [1, 2]. It is a progressive and crippling disease that leads ultimately to death. FAP is associated with point mutations in transthyretin (TTR) a homotetrameric protein mainly produced in the liver and the choroid plexus in the brain and found serum, cerebrospinal fluid and saliva. Over 80 TTR point mutations are related to amyloidogenic behavior and amyloidotic diseases with systemic amyloid fiber formation with the characteristic β -sheet cross structure commonly found in several other neurodegenerative disorders such as Alzheimer and Parkinson [3]. Transthyretin amyloidosis (ATTR) is not only an important and widespread disease but is also an outstanding model pathology to understand other conformational disorders associated to misfolding, aggregation and amyloid fiber formation. The only effective therapeutic option for ATTR is liver transplantation from cadaveric donors since serum TTR is produced only in the liver. Moreover, domino liver transplantation from ATTR patients, a practice recently introduced to obviate the shortage of livers available for transplantantion, introduces mutated TTR forms in circulation, increasing the risk of ATTR. [4]. Currently, the main hypothesis for ATTR pathogenesis considers that point mutations cause TTR tetramer instability favoring its dissociation to non-native

monomeric species with the ability to self-associate [5]. These soluble monomers aggregate and evolve to insoluble multimeric forms leading to amyloid fibers with the characteristic β cross sheet [4; 6]. However, this model fails to explain two crucial aspects of TTR amyloid formation and pathogenesis. First, mutations are not required for TTR amyloid formation. Indeed, non-mutated TTR also forms amyloid deposits in systemic senile amyloidosis, a crippling disease in later life [7], in fact after liver transplantation TTR WT still forms amyloids fibers and survival after liver transplantation for TTR amyloidosis may be associated with progression of neuropathy due to continued deposition of amyloid derived from wild-type TTR [8]. Moreover, a considerable number of TTR mutation carriers are asymptomatic throughout their lives [9]. Thus, point mutations only modify TTR's intrinsic amyloidotic nature and are not absolute predictors of amyloid formation or disease development. Second, disease onset time varies by decades for different patients bearing the same mutation [10]. The genetic trait frequency in different areas is not correlated with the number of known cases [11]. Furthermore, discordant symptoms in homozygote twins were reported and while one of the twins underwent liver transplantation, the other remained healthy for at least 8 years after his brother's disease onset [12]. It is also noteworthy that the homozygous ATTR V30M patients do not develop a more aggressive disease form than the heterozygous ones [13, 14, 15]. The most likely explanation for these observations is the involvement of non-genetic factors in ATTR onset and disease progression. Uncovering the nature of these non-genetic factors and the molecular mechanisms of their actions is likely to have a major impact on the knowledge of other conformational diseases. The two most important non-

genetic factors that may directly affect protein structure and function are clearly protein interacting partners and post-translational modifications. In the first one, it is remarkable that TTR does not form amyloid deposits in the brain because it is non-covalently bound to retinol and to the retinol binding protein (RBP) that prevents tetramer dissociation and amyloid fiber formation. Could the disruption of a similar mechanism be involved in familial amyloidotic polyneuropathy? Concerning the second, among a legion of post-translational modifications, glycation is the common link in amyloidotic pathologies, being found in Alzheimer, Parkinson and familial amyloidotic polyneuropathy. One of the most powerful glycation agents *in vivo* is methylglyoxal formed in all living cells from dihydroxyacetone phosphate and D-glyceraldehyde 3-phosphate, as a non-enzymatic glycolysis by-product [16]. Methylglyoxal irreversibly modifies both lysine and arginine residues in proteins forming advanced glycation end products, termed MAGE (methylglyoxal derived advanced glycation en-products) [16]. Arginine-derived MAGE appear to be more relevant considering the existence of specific receptors for hydroimidazolones [17]. Argpyrimidine [N δ -(5-hydroxy-4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)-L-ornithine] is another arginine MAGE [18] thoroughly found *in vivo* [19, 20]. Methylglyoxal glycation was found in several conformational pathologies such as Alzheimer [21, 22, 23, 24], dialysis-related amyloidosis [25] Parkinson [26], prion diseases [27], hemodialysis-related A β 2M amyloidosis, [28] and murine AApoAII amyloidosis [29]. We discovered that amyloid fibers in ATTR patients are glycated by methylglyoxal, by quantifying argpyrimidine, bringing further support to the glycation hypothesis of conformational diseases [20].

Here we show that FAP patients present higher levels of argpyrimidine-modified proteins in serum. Moreover, we discovered that fibrinogen is one of the main TTR interacting proteins in serum and that it specifically shows increased glycation in FAP patients. Since fibrinogen was recently found to be a chaperone protein and we demonstrated in this work that upon glycation by methylglyoxal its chaperone activity decreases, we created a new molecular model for TTR amyloidogenesis *in vivo*. In familial amyloidotic polyneuropathy, increased glycation of fibrinogen reduces its chaperone activity, reducing TTR tetramer stability and triggering the pathway to aggregation, amyloid formation and disease.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Serum Collection - Blood samples from control individuals, familial amyloid polyneuropathy (FAP) patients (four females each group, age range 26–33 years) and transplanted individuals (males age range 24–41 years for orthotic liver transplantation (OLT) and age range 43–58 years for domino (or sequential) liver transplantation (DLT)) were collected to citrate containing tubes. All patients gave informed written consent and the protocol was approved according to EEC ethic rules and the Helsinki protocol. Blood was collected by venous puncture to citrate containing tubes, centrifuged at 1,800 *g* for 5 min at 4°C and the collected serum was immediately frozen at -80°C until further analysis.

Polyacrylamide Gel Electrophoresis - Serum proteins were separated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (12% SDS-PAGE), in mini-gel format (7x7 cm Tetra system from Bio-Rad). Twenty micrograms of serum protein were used per lane. Protein concentration was determined by the Bradford protein assay, using bovine

serum albumin as standard (Bio-Rad). Samples were diluted 10 fold in MilliQ water and mixed with reduction buffer (62,5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 20% (v/v) Glycerol, 2% (w/v) SDS, 5% (v/v) β -mercaptoetanol). Prior to electrophoresis, samples were heated at 100 °C for 5 min. Protein bands were stained with Coomassie brilliant blue R-250.

Two Dimensional Electrophoresis - Samples containing 15 or 250 μ g of serum protein were used for IEF (isoelectric focusing) using immobiline dry strips of 7 or 13 cm, respectively, with a non linear pH gradient from 3 to 11 [30] (Amersham Biosciences). After IEF separation, proteins were reduced and alkylated in the dry strip. Second dimension SDS-PAGE was performed using 12% acrylamide/bisacrylamide. Protein spots were stained with Coomassie brilliant blue R-250.

Western Blotting - For Western blot analysis, proteins were transferred from the polyacrylamide gel to PVDF membranes (Millipore) and stained with Ponceau S to monitor protein transfer. Membranes were blocked overnight at 4 °C with TBS (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5) containing 5% skimmed milk. Thereafter, the membranes were incubated overnight at 4 °C with the primary antibody used in TBS-T (TBS Buffer with 0.1% Tween 20) containing 1% skimmed milk. Antibodies used were: anti human TTR polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology) at a dilution of 1:5000; anti argpyrmidine (Jaica) at a dilution of 1:2000; anti human soluble RAGE (Santa Cruz Biotechnology) at a dilution of 1:5000; anti-fibrinogen (Calbiochem) at a dilution of 1:10000. Membranes were washed three times for 10 min each with TBS and incubated for 1 h at room temperature with anti-rabbit IgG (Roche) (at 1:10000 dilution) and anti-mouse IgG (Roche) (at 1:10000 dilution), for TTR, fibrinogen, RAGE and

MGO-derived AGE (argpyrmidine). Immunoreactivity was detected with diaminobenzidine (DAB) as a chromomeric substrate, following the manufacturer's instructions (Pierce). Each dried blot was scanned at 600 dpi (dots per inch) and saved as a TIFF file. Image analysis performed using the public domain *ImageJ* program (National Institutes of Health, available at <http://rsb.info.nih.gov/ij/>), using the "Gel Analysis" functions. Background correction was done using a "rolling ball" method with a radius of 4 times the width of a band. Result of the analysis is a value for each band which is proportional to the Integrated Density Value (IDV) of that band [31].

In Gel Protein Digestion - Protein bands were manually excised from the gels and digested using trypsin as described [34]. 2010. Briefly gel protein bands were washed in milliQ water and destained in 50% acetonitrile (ACN) and subsequently with 100% ACN. Cys residues were reduced with 10 mM DTT and alkylated with 50 mM iodoacetamide. Gel pieces were dried by centrifugation under vacuum and rehydrated in digestion buffer containing 50 mM NH_4HCO_3 and 6.7 ng/ μ L of trypsin (modified porcine trypsin, proteomics grade, Promega) at 4 °C. After 30 min the supernatant was removed and discarded and 20 μ L of 50 mM NH_4HCO_3 were added. Digestions were allowed to proceed at 37 °C overnight (16-18 hours). After digestion, the remaining supernatant was removed and stored at -20 °C [32].

Mass Spectrometry - To identify target proteins and assign the glycated proteins a MALDI-TOF/TOF 4800 Plus mass spectrometer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) was used. Desalting and concentration of tryptic peptides was carried out with home-made chromatographic microcolumns using GELoader tips packed with POROS R2 (Applied Biosystems, Foster

City, CA, USA). Peptides were directly eluted from the microcolumns onto the MALDI plate using α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (5 mg.mL⁻¹) in 50% (v/v) CH₃CN with 0.1 % (v/v) formic acid. MS Experiments were performed in positive reflectron mode for monoisotopic peptide mass determination. The mass spectrometer was externally calibrated using des-Arg-Bradykinin (904.468 Da), angiotensin 1 (1296.685 Da), Glu-Fibrinopeptide B (1570.677 Da), ACTH (1-17) (2093.087 Da), and ACTH (18-39) (2465.199) (4700 Calibration Mix, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). MS Spectra was collected in a result-independent acquisition mode, typically using 1000 laser shots per spectra and a fixed laser intensity of 3000V. For tandem experiments, fifteen of the strongest precursors were selected for MS/MS, the weakest precursors being fragmented first. MS/MS Analyses were performed using CID (Collision Induced Dissociation) with 1 kV collision energy and 1 x 10⁶ torr air pressure. 2000 Laser shots were collected for each MS/MS spectrum using a fixed laser intensity of 4000V. Raw data were generated by the 4000 Series Explorer Software v3.0 RC1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and tryptic peptide contaminant *m/z* peaks resulting from trypsin auto digestion (842.508 Da; 1045.564 Da; 2211.108 Da; 2225.119 Da) were excluded when generating the peptide mass list used for comparison with the theoretical tryptic digest. Proteins were identified by the GPS explorer (Applied Biosystem) and further confirmed using the ProteinPilot software (Applied Biosystem). To identify glycosylated-modified peptides and amino acid residues, an inclusion list with predicted monoisotopic masses for modified peptides of the identified proteins were loaded to the tandem MS mode. Confirmation of the presence of glycosylated peptides by mass spectrometry was performed as previously

described [33]. Briefly, protein glycation, the modification of lysine and arginine side chains, causes misscleaves when hydrolysing proteins with trypsin. If lysine or arginine residues are modified, it is possible to predict the mass increase associated to known AGE in a peptide with a misscleavage. For the relative quantitation of TTR variants in heterozygotic subjects, tryptic peptides were desalted and concentrated using Poros reverse phase R2 (Applied Biosystems) and eluted directly to the MALDI target AnchorChip (Bruker Daltonics, Bremen) with a matrix solution of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA; Fluka) prepared at a concentration of 10 μ g/ μ L in 50% ACN with 0.1% TFA. Peptide mixtures were analyzed by MALDI-FTICR-MS in a Bruker Apex Ultra, Apollo II Combi-Source (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), with a 7 Tesla magnet (MagneX Corporation, Oxford UK). Monoisotopic peptide masses were determined using the SNAP 2 algorithm in Data Analysis software version 4.0 (Bruker Daltonics). External calibration was performed by using BSA tryptic digest spectrum, and the data processed and analyzed with Biotoools 3.2 (Bruker Daltonics, Bremen) [34, 35].

TTR-GST Pull Down assay in serum - Human TTR cloned in p426GPD was cleaved with the restriction enzymes *Bam*HI and *Xho*I. The inserts were purified after electrophoresis separation on 1% (w/v) agarose gel in TBE buffer. The expression vectors pGEX 4T.2 TTR was obtained by ligation of the inserts with the expression vector pGEX 4T.2 (Amersham biosciences), which was doubly digested with *Bam*HI and *Xho*I. The vectors pGEX 4T.2 TTR was transformed into *E. coli*. DH5 α and purified using a High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche). For the recombinant protein expression and purification, the resulting construct was transformed into *E. coli* BL21+

by heat shock and a single colony was used to inoculate 10 mL of Luria Broth (LB) medium supplemented with ampicillin (50 µg/mL) at 37 °C with shaking. The culture was grown overnight and 10 mL was used to inoculate 1 L of LB medium at 37 °C. Protein expression was induced with 1 mM IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) when the absorbance at 600 nm reached 0.4. After 3 hours of growth, cells were immediately chilled on ice and harvested by centrifugation at 15000 *g* for 20 min at 4 °C. Cells were frozen overnight at – 80 °C and afterwards the pellet was resuspended in 10 mL phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, sonicated 10 times for 30 s and centrifuged for 20 min at 14000 *g* at 4 °C. Supernatant was stored at -80°C until use. TTR in fusion with glutathione S-transferase (GST) (pGEX 4T.2 TTR) and GST alone (pGEX 4T.2) were purified with glutathione sepharose 4BT beads (Amersham). The recombinant proteins and serum were incubated with rotation at 4°C for 3 hours and washed four times with washing buffer (100 mM potassium acetate, 30 mM Hepes-KOH at pH 7,5, 2 mM of leupeptine, aprotinine and PMSF). Serum was diluted 1:2 in washing buffer before incubation. After washing, bound proteins were eluted from the beads with denaturing buffer (117 mM Tris HCl, pH 6,8, 3,4% (w/v) SDS, 12% (v/v) Glycerol, 1,7% (v/v) beta-mercaptoethanol and 0,04% (w/v) bromophenol blue) and boiled for 5 min. Eluted proteins were separated by SDS-PAGE using 12% resolving gels, which were silver stained using a silver staining kit (GE Healthcare). Each pull down assay was repeated at least three times [36].

Methylglyoxal preparation - High purity methylglyoxal was prepared by fractional distillation under reduced pressure in nitrogen atmosphere [37]. Once prepared, methylglyoxal solutions were standardized by

enzymatic assay with glyoxalase I and II. Purity was verified by HPLC analysis and ¹³C NMR (Bruker advance 400 MHz, Billerica, MA, USA).

Glycation in vitro of α-crystallin and human fibrinogen with methylglyoxal - Bovine lens α-crystallin and human fibrinogen (10 mg/ml) in 0,1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) were incubated with 2.5 and 10 mM of MG in sterile conditions for 7 days at 37°C. Following incubations, all samples were dialyzed against 0,1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) for 48 hours at 4°C. Proteins were dialyzed overnight in 0,1 phosphate buffer (pH 7.0) at 4°C.

Chaperone activity assay of α-crystallin and human fibrinogen - Chaperone activity of α-crystallin (Sigma) and human fibrinogen (Calbiochem) were assayed in a Beckman DU 7400 spectrophotometer. Total reaction volume was 2,5 ml. Five milligrams of insulin or two milligrams of lysozyme (Sigma) were incubated with 2 mM DTT in 0,1 phosphate buffer (pH 7.0) containing 2 mM EDTA at 37°C and absorption increase due to increased light scattering in time was monitored at 360 nm for 60 min at 37°C. α-Crystallin and human fibrinogen were added to the mixture at twice the molar concentration of the target protein.

RESULTS

Differential serum protein glycation in FAP patients - We discovered that argpyrimidine is present in amyloid fibrils from Portuguese type FAP patients [20], being the first evidence that methylglyoxal-protein glycation is involved in FAP and that glycation might play an important role in this pathology. In this work, we compared the glycated serum proteomes from control subjects and FAP patients, targeting argpyrimidine as a specific marker of

methylglyoxal glycation. Serum proteins from control and FAP individuals were separated by SDS-PAGE and argpyrimidine modified proteins were detected by Western blot with a specific antibody against this MAGE (Figure 1B). Although glyated proteins were found in both control and FAP subjects, in the latter cases, a higher number of argpyrimidine glyated are present in FAP serum patients in comparison to control subjects. This is particularly noticeable in a protein band with a molecular mass of 80 kDa which shows a strong signal for argpyrimidine only in FAP individuals and corresponds to a faint protein band in control subjects (Figure 1B). It is noteworthy that common and differentially glyated proteins present a similar pattern in all four controls and FAP individuals, showing a high homogeneity and specificity of serum protein glycation in different individuals.

To identify these argpyrimidine modified proteins, serum proteins were separated by 2D-PAGE and proteins were detected by western blot using a specific anti-argpyrimidine antibody (Figure 2A). In red (spots 1-11) we assigned glyated proteins found in both control and FAP individuals, whereas blue (spots 12-16) shows assigned glyated proteins found only in FAP patients. The molecular mass of these proteins spots is similar to the protein bands detected by western blot for argpyrimidine in one-dimensional electrophoresis and most likely corresponds to multiple forms of the same protein. All assigned protein spots were excised from Coomassie stained two dimensional gels (Figure 2B), digested with trypsin and proteins identified by MALDI-TOF-TOF-MS using tandem MS data (Table 1). As previously discovered by our group, MS the spectra of tryptic digested glyated proteins contains information regarding the nature and location of the glyated [33]. Since only arginine residues are modified by methylglyoxal with the formation of

argpyrimidine, tryptic digestion of glyated proteins will produce peptides with an arginine miss cleavage associated with an 80 Da mass increase, characteristic of an argpyrimidine modification. To identify the glyated peptides residues, protein spots corresponding to the differentially glyated proteins were removed from the 2D-PAGE gels of FAP patients serum, digested with trypsin and analysed by mass spectrometry. Proteins from control individuals' 2D gels spots, matching the glyated proteins spots in the FAP individuals' 2D gels, were also removed and the tryptic digested protein mass spectra were acquired and compared. A peptide was considered to be glyated only and only if it was absent from the MS spectra of the control sample (FIG 5, Table 1). The differentially argpyrimidine glyated proteins in FAP individuals were identified as several isoforms of fibrinogen and immunoglobulins. To investigate if the higher levels of protein glycation observed in FAP patients were related to any diabetes risk factors, we analysed the isoforms of the RAGE protein, which lack the transmembrane and signaling domains (commonly referred to as soluble RAGE or sRAGE) levels by western blot (Figure 1C). Additionally, a growing number of studies demonstrate that increased circulation levels of sRAGE are protective against a range of diseases and enhance longevity. Hence, sRAGE levels might be a good tell-tale of the general clinical condition [39]. It was previously observed that circulating sRAGE levels negatively correlate to body mass index and waist:hip ratio (known risk factors for diabetes, vascular diseases and AD), supporting a possible protective role for these proteins before any evidence of diabetic or vascular complications occurred [39]. As expected since FAP individuals studied presented no diabetes background, no differences were

observed in sRAGE levels in circulation, control and FAP patients.

Decreased TTR stability in FAP patients - TTR is a tetramer composed of two dimers that bind to each other and due to the large difference in the number of hydrophilic interactions, the monomer-monomer contacts within the dimer are more stable than the dimer-dimer interactions [40].

TTR tetramer and dimer dissociation are essential steps towards aggregation and amyloid fibrils formation. Therefore, we analysed the relative amounts of TTR monomers and dimers in FAP and control subjects by SDS-PAGE of serum samples pre-treated with 2% SDS at room temperature or with boiling, as previously used to evaluate the relative amount of TTR dimer to monomer species [41]. Also, the stable sample-specific dimer/monomer ratios, achieved under conditions of partial dimer to monomer transition, reflect the conformational monomer stability relative to the dimeric form [42]. Once a dimer dissociates, the monomers are captured in a complex with SDS and their ability to associate as a dimer. After SDS-PAGE separation, under conditions of partial dimer to monomer transition, TTR from control and FAP groups was detected by western blotting, allowing the observation of both dimer and monomer and also its relative quantification (Figure 1A). Monomer and dimer area signals obtained by western blot were measured using ImageJ software. The intensity of each protein band was normalized using the western blot sRAGE protein band signal, for each lane, respectively. We observed that FAP individuals present a significantly lower (t-test for the significance of the difference between the means of two independent samples; $p=0.0253$) ratio of dimer/monomer

than control individuals. This observation is in agreement with *in vitro* models of FAP amyloidosis, which revealed a positive relationship between TTR amyloidogenic potential due to a mutation and tetramer stability decrease [6].

Serum protein glycation increases and TTR stability decreases over time in sequential liver transplanted individuals - Since serum TTR is produced by the liver, the progression of the disease can be halted by OLT. This hypothesis was first validated in 1990 in Sweden since OLT lead to the V30M TTR clearance from serum of the FAP liver transplanted recipient [43]. DLT using grafts from FAP patients was first performed in 1995 [44] and more than 400 domino transplants were carried out by the end of 2005, according to the Familial Amyloidotic Polyneuropathy World Transplant Registry (<http://www.fapwtr.org>). The age of onset in FAP TTRV30M ranges from the late 20s to early 40s. It was therefore expected that liver explanted from FAP patients would function in recipients without formation of amyloid fibrils for a long period. However, at least 3 recent reports [45, 46] indicate that amyloid deposition or FAP symptoms appear in domino recipients much sooner than expected.

We collected samples of individuals that were subjected OLT and DLT, from 1 month to 11 years and from 2 months to 4 years, respectively and monitored TTR dimer and argpyrimidine-modified proteins by western blot analysis. As shown in Figure 3A, TTR dimer maintains its stability over time in FAP individuals that were subjected to OLT, for that moment on having only TTR WT present in circulation. Likewise, there is no change over time both in the number and relative amount of glycated serum proteins after this liver transplantation (Figure 3 A). In contrast, the opposite was observed for individuals

who were subjected to DLT. As shown in Figure 3 B, the glycation of serum proteins increases over time after DLT. For the same time lapse we observed a significant reduction of TTR dimer stability in these individuals.

In this work, all TTR mutation carrying individuals or patients subjected to sequential liver transplantation, are heterozygous, meaning that the liver expresses both the mutated (V30M) and the native form of TTR. To exclude the hypothesis that the observed minor stability of the dimer could be due to the differential amount of the two TTR forms expressed by the latter livers (WT and V30M) over time, we determined the WT to V30M ratio by MALDI-FTICR-MS [34, 35]. The ratio between the two TTR forms expressed presents no pattern in all cases studied. As expected, it only shows slight differences between individuals, (Supplementary Table 2, Supplementary Figure 1).

Fibrinogen is a TTR protein interaction partner in seru -. To uncover the protein interaction network of serum TTR we used affinity purification assays to identify its putative protein binding partners. For these assays, TTR was expressed in bacteria as a GST fusion product, purified and used as bait in a pull down assay from control and FAP serum. As negative control, GST was expressed in bacteria, purified and used as bait. The proteins specifically eluting with the TTR tagged protein were identified by MS/MS peptide mapping. As depicted in Figure 4 A, nine proteins were identified as specifically eluting with the TTR tagged protein: five were co-purified with TTR from both control and FAP serum (proteins bands 1,2,3,4 and 8, labelled with red arrows), three were co-purified only from FAP serum (protein bands 5,6 and 7, labelled with green arrows) and one was purified only from

control serum (protein band 9, labelled with blue arrow). The retinol binding protein (RBP) was identified in co-elutions from both control subjects and FAP patients, validating the pull down experiment since RBP is a well known TTR binding partner, in serum and the cerebrospinal fluid (Figure 4 A, protein band 8). Several proteins were identified as TTR interacting partners in serum, namely albumin, immunoglobulins and cis-trans isomerase (Table 3). Among these, fibrinogen deserves a closer look not only because of its chaperone activity but also due to its differential glycation pattern that distinguishes control subjects from FAP patients. To validate this result the affinity purification assay was repeated and fibrinogen beta chain was detected by western blot (Figure 4 B). From both control and FAP patients, fibrinogen beta chain was unequivocally purified by TTR tagged protein pull-down assay. Considering the fact that protein glycation by methylglyoxal is known to exert effects on the activity of chaperone proteins we speculated that this could also be the case of fibrinogen and as such, to be related with FAP.

Glycation Decreases Fibrinogen Chaperone activity - To investigate the effects of glycation on fibrinogen's chaperone activity, we incubated human fibrinogen with high purity methylglyoxal, prepared in house as described, using two different concentrations 2,5 and 10 mM (Figure 5 B). Since argpyrimidine modification of α -crystallin has been described as largely responsible for the increased chaperone function [47], this protein was also glycated *in vitro* and used as a positive control. We then compared the ability of glycated and non-glycated lens α -crystallin to prevent chemically induced protein aggregation of two target proteins, insulin, a model protein for chaperone studies and lysozyme, a plasma

protein. As it can be observed in Figure 5 C, argpyrimidine modification increased α -crystallin's chaperone activity by nearly 2-fold, as expected, when using insulin as target protein. Similar results were obtained with lysozyme thus, confirming the increased chaperone activity of α -crystallin upon glycation by methylglyoxal (Figure 5 C). Insulin and lysozyme aggregation were significantly suppressed by fibrinogen (t-test for the significance of the difference between the means of two independent samples; $p=0.011$ for insulin and $p=0.061$ for lysozyme). Fibrinogen glycation by methylglyoxal significantly suppresses its chaperone activity when both insulin and lysozyme were used as target proteins. Interestingly, human fibrinogen presents an increased expression in FAP patients, as shown in figure 5 A. Higher levels of this protein were also observed in other amyloid disorders, such as Alzheimer and vascular dementia [48].

DISCUSSION

In this work, we showed that a few serum proteins are differentially glycosylated in FAP patients in comparison with healthy control subjects. Moreover, after sequential transplantation these glycosylated proteins increase its abundance over time. We have also discovered that fibrinogen, one of the differentially glycosylated proteins, is a TTR interacting partner in serum. Moreover, it was recently discovered that fibrinogen has chaperone activity and we demonstrated in this work that upon glycation by methylglyoxal its chaperone activity decreases. Taken together, these observations lead us to speculate that fibrinogen glycation *in vivo* reduces its chaperone activity, compromising TTR tetramer.

Although all FAP patients have identical concentrations of TTR V30M in plasma and

cerebrospinal fluid, age at onset varies widely between 20 and 70 years old. Therefore, despite the identification transthyretin mutations associated to FAP, the process of fibril formation and its toxicity remains unclear. Formation of amyloid fibrils by non-mutated transthyretin, as in SSA (senile systemic amyloidosis) [49, 50] implies that other factors besides genetic ones must be considered in FAP's pathogenesis. Since the first symptoms in FAP appear much earlier than in SSA, TTR point mutations seem to accelerate fibril formation only by increasing TTR amyloidogenicity. Furthermore, different amyloidotic proteins, with no sequence homology, form similar amyloid fibrils [51]. And in most conformational diseases like Alzheimer and parkinson, sporadic cases are prevalent.

Identification of AGEs in FAP patients was previously described in long lived avascular tissues with low turnover, like vitreous bodies and amyloid fibrils and it was suggested that these tissues were more prone to undergo glycation [52]. We evaluated methylglyoxal-derived AGE in the serum of FAP patients, relatively to control individuals. We detected two proteins differentially glycosylated by argpyrimidine in FAP individuals. These results are surprising since AGEs are commonly related to hyperglycaemia conditions and FAP patients do not present a disturbed metabolism of glucose, actually showing hypoglycaemia after transient hyperinsulinemia upon oral administration of a loading dose of glucose. Furthermore, FAP patients showed transient hypoglycaemia during their daily life [53]. AGEs' modifications are associated with crosslink formation, matrix dysfunction, reduced protein solubility and increased protease resistance, and they are now also implicated in the pathophysiology of normal ageing and in the pathogenesis of long-term complications of diabetes [18±21]. Normally

AGE formation depends critically on the plasma concentration of glucose, methylglyoxal and other glycation agents [54] and these compounds are strongly associated with the severity of diabetes complications, particularly cardiovascular and renal ones, particularly methylglyoxal. We speculate that glycation in FAP might be related to renal failure. Indeed, in renal failure, plasma and tissue levels of AGEs are completely independent of serum glucose [55]. FAP patients present low levels of Erythropoietin erythropoietin (EpoI), suggesting that this abnormalities could be related to the amyloid deposits in renal interstitium [56]. Renal disease in FAP patients ranges from proteinuria to end-stage renal failure (ESRF), with replacement of renal function by dialysis. In comparison with FAP patients with normal renal function, the progression of the neurologic disease is retarded in FAP patients enduring dialysis. However, haemodialysis and haemodiafiltration are ineffective in removing TTR, in spite of the lower stability of the TTR Met30 variant. Since the protective feature of haemodialysis on the progression of amyloidosis is not due to the clearance of this abnormal protein from plasma [57], we can speculate that serum glycation agents are removed by haemodialysis and so it's contributing to FAP symptoms progression decreases after this procedure.

Human fibrinogen specifically interacts with and suppresses aggregation of a wide spectrum of stressed proteins [58]. It was previously described that human fibrinogen can inhibit the formation of Sup35 fibril, which shares key features of amyloid fibers of mammalian prions and amyloid proteins [59] indicating a potential role of Human fibrinogen on misfolding diseases as a molecular chaperone. It was suggested that Human fibrinogen can interact with

prefibrillar species during the fibril formation process, redirecting the aggregation process. It is also interesting to note that high levels of human fibrinogen are also related to both Alzheimer's disease and vascular dementia [60]. We observed that fibrinogen expression is increased in FAP patients. It is then highly plausible that the increased levels of human fibrinogen present in these patients may be a response to the additional request of extracellular chaperone functions under such pathological conditions and they are aggravated by fibrinogen glycation which decreases its chaperone activity, as discovered in this work.

It is well known that protein structure and biological function are altered upon glycation [61]. Moreover, the results show that human fibrinogen interacts with TTR in the serum. We can speculate that fibrinogen interacts with TTR as a chaperone reducing its propensity towards fiber formation. When fibrinogen is glycated, this function is lost or compromised and TTR has a higher tendency for aggregation.

Although liver transplantation has become a well-established treatment for halting the progression of FAP-related clinical symptoms, no truly effective therapy has been designed [62, 63, 64] and several problems have arisen [65, 66].

Timing for liver transplantation is still one of the main problems associated to this therapy. On one hand, amyloidogenic transthyretin (ATTR) gene carriers who have no clinical symptoms cannot undergo liver transplantation before the onset of the disease. On the other hand, FAP's clinical complications present before the surgery will remain present after liver transplantation. We believe that glycation in FAP individuals can be further investigated targeting its use as a biomarker long before symptoms appear. Moreover, the effects of glycation on chaperone activity in connection with other

conformational diseases are likely to be of high relevance for the understanding of the biochemical mechanisms underlying these pathologies and may offer novel therapeutic opportunities.

REFERENCES

1. Andrade C, (1952) Brain **75**(3), 408-27
2. Saraiva MJ, Birken S, Costa PP, and Goodman DS (1984) J Clin Invest. **74**(1),104-19
3. Kelly JW, Colon W, Lai Z, Lashuel HA, McCulloch J, McCutchen SL, Miroy GJ and Peterson SA (1997) Adv Protein Chem. **50**, 161–81.
4. Connors LH, Lim A, Prokaeva T, Roskens VA and Costello CE (2003) Amyloid **10**, 160–184.
5. Saraiva, M. (2001) FEBS Letters **498**(2), 201-203.
6. Quintas A, Vaz DC, Cardoso I, Saraiva MJ and Brito RM (2001) J Biol Chem. **276**(29), 27207-13
7. Westermark P, Sletten K, Johansson B and Cornwell GG 3rd (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **87**, 2843–2845 Neurology. **75**(4), 324-7
8. Tanaka M, Hirai S., Matsubara E, Okamoto K, Morimats M, and Nakazato M (1988) Neurosurgery, and Psychiatry **51**, 576-578
9. Rudolph T, Wilhelm Kurz M, and Farbu E (2008) Clin Med Res. **6**(2), 80–82.
10. Holmgren G, Hellman, U, Lundgren H, Sandgren O and Suhr O (2005) J Med Genet **42**, 953–956
11. Holmgren G, Ando Y, Wikström L, Rydh A and Suhr OB (1997) Amyloid **4**(3), 178-180
12. Holmgren G, Wikström L, Lundgren HE and Suhr OB (2004) J Intern Med. **256**(5), 453-6.
13. Munar-Qués M, Pedrosa JL, Coelho T, Gusmão L, Seruca R, Amorim A, Sequeiros J (1999) J Med Genet **36**(8), 629-32.
14. Ikeda S, Nakano T, Yanagisawa N, Nakazato M and Tsukagoshi H (1999) Eur Neurol. **32**(6), 308-13
15. Richard JP (1993) Biochem Soc Trans. **21**, 549–553.
16. Westwood ME, Argirov OK, Abordo EA and Thornalley PJ (1997) Biochim. Biophys. Acta. **1356**, 84–94
17. Shipanova IN, Glomb MA, Nagaraj RH (1997) Arch. Biochem. Biophys. **344**, 29–36
18. Wilker SC, Chellan P, Arnold BM and Nagaraj RH (2001) Analytical Biochemistry **290**(2), 353-358
19. Gomes R, Sousa Silva M, Quintas A, Cordeiro C, Freire A, Pereira P, Martins A, Monteiro E, Barroso E and Ponces Freire A (2005) Biochem J. **15**, 339-45.
20. Du Yan S, Zhu H, Fu J, Yan S. F, Roher A, Tourtellotte WW, Rajavashisth T,, Godman GC, Stern D, Schmidt AM (1997). Natl. Acad. Sci. U.S.A. **94**, 5296–5301
21. Vitek MP, Bhattacharya K, Glendening JM, Stopa E, Vlassara H, Bucala R, Manogue K and Cerami A (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **91**, 4766–4770.
22. Yan SD., Chen X, Schmidt AM, Brett J, Godman G, Zou YS, Scott CW, Caputo C, Frappier T and Smith MA (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **91**, 7787–7791.
23. Münch G, Schinzel R, Loske C, Wong A, Durany N, Li JJ, Vlassara H, Smith MA, Perry G and Riederer P (1998) J Neural Transm **105**, 439-461
24. Miyata T, Inagi R, Iida Y, Sato M, Yamada N, Oda O, Maeda K and Seo H (1994) J. Clin. Invest. **93**, 521–528.
25. Münch G, Lüth HJ, Wong A, Arendt T, Hirsch E, Ravid R and Riederer P (2000) J Chem Neuroanat. **20**(3-4), 253-7

26. Sasaki N, Takeuchi M, Chowei H, Kikuchi S, Hayashi Y, Nakano N, Ikeda H, Yamagishi S, Kitamoto T, Saito T, Makita Z (2002) *Neurosci Lett* **326**, 117-120
27. Miyata T, Oda O, Inagi R, Iida Y, Araki N, Yamada N, Horiuchi S, Taniguchi N, Maeda K, Kinoshita T (1993) Beta 2-microglobulin modified with advanced glycation end products is a major component of hemodialysis-associated amyloidosis. *J Clin Invest* **92**:1243-1252
28. Hoshii Y, Kawano H, Gondo T, Takahashi M, Ishihara T, Higuchi K, Horiuchi S (1996) *Pathol Int* **46**, 738-742
29. Weiss W and Görg A (2009) *Methods Mol Biol.* **564**, 13-32
30. Rasband WS (1997-2005) ImageJ, US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA <http://rsb.info.nih.gov/ij/>.
31. Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV and Mann M (2006) *Nat Protoc.* **1**, 2856-2860
32. Gomes RA, Oliveira LM, Silva M, Ascenso C, Quintas A, Costa G, Coelho AV, Sousa Silva M, Ferreira AE, Ponces Freire A and Cordeiro C (2008) *Biochem J.* **416**(3), 317-26.
33. da Costa G, Gomes R, Correia CF, Freire A, Monteiro E, Martins A, Barroso E, Coelho AV, Outeiro TF, Ponces Freire A and Cordeiro C (2009) *Amyloid.* **16**(4), 201-207
34. da Costa G, Guerreiro A, Correia CF, Gomes R, Freire A, Monteiro E, Barroso E, Coelho AV, Outeiro TF, Freire AP and Cordeiro C (2010) *PROTEOMICS - Clinical Applications.* **4**(6-7), 674-678
35. Brymora A, Valova VA and Robinson PJ (2004) *Curr Protoc Cell Biol.* **17**, Unit 17.5
36. McLellan AC, Phillips SA and Thornalley PJ (1992) *Anal Biochem* **206**, 17-23.
37. Geroldi D, Falcone C, Minorette P, Emanuele E, Arra M and D'Angelo A (2006) *J. Am. Geriatr. Soc.* **54**(7), 1149-1150.
38. Norata GD, Garlaschelli K, Grigore L, Raselli S, Buccianti G ND Catapano AL (2008) *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **19**(2), 129-134
39. Blake CCF, Geisow MJ, Oatley SJ, Rérat B and Rérat C (1978) *J. Mol. Biol.* **121**, 339-356.
40. Colon W and Kelly JW (1992) *Biochemistry* **31**, 8654-8660
41. Altland K and Winter P (2003) *Electrophoresis.* **24**(14), 2265-71.
42. Holmgren G, Steen L, Ekstedt J, Groth CG, Ericzon BG, Eriksson S, Andersen O, Karlberg I, Nordén G, Nakazato M, Hawkins P, Richardson S and Pepys M (1991) *Clin Genet* **40**, 242-246
43. Azoulay D, Samuel D, Castaing D, Adam R, Adams D, Said G and Bismuth H (1999) *J Am Coll Surg* **189**, 584-593
44. Sousa MM, Ferrao J, Fernandes R, Guimaraes A, Geraldés JB, Perdigoto R, Tomé L, Mota O, Negrão L, Furtado AL and Saraiva MJ. (2004) *Lab Invest* **84**, 865-873
45. Takei Y, Gono T, Yazaki M, Ikeda S, Ikegami T, Hashikura Y, Miyagawa S and Hoshii Y (2007) *Liver Transpl.* **13**(2), 215-8
46. Nagaraj RH, Oya-Ito T, Padayatti PS, Kumar R, Mehta S, West K, Levison B, Sun J, Crabb JW and Padival AK (2003) *Biochemistry* **42**(36), 10746-55
47. Van Oijen M, Witteman JC, Hofman A, Koudstaal PJ and Breteler MM (2005) *Stroke.* **36**, 2637-2641
48. Benson MD (1989) *Trends Neurosci.* **12**, 88-92
49. Westermarck P, Sletten K, Johansson B and Cornwell GG III (1990) *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **87**, 2843-2845

50. Ghiso J, Wisniewski T and Frangione B (1994) *Mol. Neurobiol.* **8**, 49–64
51. Nyhlin N, Ando Y, Nagai R, Suhr O, El Sahly M, Terazaki H, Yamashita T, Ando M and Horiuchi S (2000) *J Intern Med* **247**, 485–492
52. Ando Y, Yi S, Nakagawa T, Ikegawa S, Hirota M, Miyazaki A and Araki S (1991) *J Auton Nerv Syst.* **35**(1), 63–70
53. Dyer DG, Dunn JA, Thorpe SR, Bailie KE, Lyons TJ, McCance DR, Baynes JW. (1993) *J Clin Invest.* **91**(6), 2463–9
54. Makita Z, Radoff S, Rayfield EJ, Yang Z, Skolnik E, Delaney V, Friedman EA, Cerami A and Vlassara H (1991) *N Engl J Med.* **325**(12), 836–42
55. Beirão I, Lobato L, Costa PM, Fonseca I, Mendes P, Silva M, Bravo F, Cabrita A and Porto G (2004) *Kidney Int.* **66**(5), 2004–9
56. Beirão I, Lobato L, Riedstra S, Costa PM, Pimentel S and Guimarães S (1999) *Clin Nephrol.* **51**(1), 45–9
57. Tang H, Fu Y, Cui Y, He Y, Zeng X, Ploplis VA, Castellino FJ and Luo Y (2009) *Biochem Biophys Res Commun* **378**(3), 662–7
58. Dobson CM (1999) *Trends Biochem. Sci.* **24**, 329–332
59. Oijen MV, Witteman JC, Hofman A, Koudstaal PJ, Breteler MMB (2005) *Stroke* **36**, 2637–2641
60. Ulrich P and Cerami A (2001) *Recent Prog Horm Res.* **56**, 1–21
61. Holmgren G, Ericzon BG, Groth CG, Steen L, Suhr O, Andersen O, Wallin BG, Seymour A, Richardson S, Hawkins PN and Pepys MB (1993) *Lancet.* **341**(8853), 1113–6
62. Skinner M, Lewis WD, Jones LA, Kasirsky J, Kane K, Ju ST, Jenkins R, Falk RH, Simms RW and Cohen AS (1994) *Ann Intern Med* **120**, 133–134
63. Takei Y, Ikeda S, Hashikura Y, Ikegami T and Kawasaki S (1999) *Ann Intern Med* **131**, 592–595
64. Ando E, Ando Y and Haraoka K (2001) *Ann Intern Med* **135**, 931–932
65. Ando Y, Terazaki H, Haraoka K, Tajiri T, Nakamura M, Obayashi K, Misumi S, Shoji S, Hata K, Nakagawa K, Ishizaki T, Uemoto S, Inomata Y, Tanaka K and Okabe H (2002) *Transplantation* **73**, 674–675

FOOTNOTES

The authors wish to acknowledge Nurse Margarida for her outstanding cooperation in this work. We also acknowledge the Fundação para a Ciência e a Tecnologia do Ministério da Ciência Tecnologia e Ensino Superior, Portugal, for the Instrument Network Grant REDE/1501/REM/2005 and for grant PDTC/QUI/70610/2006. The plasmid p426GPD was a kind gift from Tiago Outeiro.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 - Western blot analysis of serum from four control and four FAP individuals to detect (A) TTR; (B) Argpyrimidine modified proteins; (C) Tetrahydropyrimidine modified proteins; (D) soluble RAGE and (E) Fibrinogen; F – Ratio between the intensity of TTR dimer and TTR Monomer, The two-tailed P value equals 0.0253; this difference is considered to be statistically significant with a 95% confidence interval.

Figure 2 – A - Two dimensional electrophoresis of Control and FAP serum proteins stained with coomassie and Western blot analysis of Argpyrimidine modified proteins in the serum of Control

and FAP after two dimensional electroforesis; B – Zoom of the gel area at which protein spots were removed. Identification of protein spots assigned are described in table 1. Red marks correspond to common glycated proteins and blue marks correspond to protein glycated differentially in FAP individuals.

Figure 3 - Western blot analysis of TTR in the serum from individuals transplanted with sequential liver (FAP) over time (from 2 months to 4 years) and from individuals transplanted with cadaveric liver (WT) over time (from 1 month to 11 years); B - Western blot analysis of argpyrimidine modified proteins in the serum from individuals transplanted with sequential liver (FAP) over time and from individuals transplanted with cadaveric liver (WT) over time.

Figure 4 – Pull down assay. A - TTR was expressed in bacteria as GST fusion protein. After purification GST alone and GST in fusion with TTR (TTR-GST) were incubated with serum, affinity purified with glutathione beads and analysed by SDS-PAGE. Purified fusion protein without serum incubation (GST-TTR), GST alone incubated with serum (GST + Control Serum for incubation with serum from control individuals and GST + FAP Serum for incubation with serum from FAP individuals) were also analysed as controls. Assigned protein bands were excised for identification; B - Western blot analysis of Fibrinogen after pull down assay.

Figure 5 – A. Western blot analysis of Fibrinogen in the serum from three control and three FAP individuals, Western blot of sRAGE was used as loading Control. B. Coomassie blue stained gel of α -crystallin and fibrinogen without glycation and glycated with 2,5 and 10 mM of methylglyoxal. Western blot analysis of Argpyrimidine modified proteins. C. Chemically (DTT) induced protein aggregation of insulin and Lysozyme in the presence of α -crystallin and fibrinogen with and without glycation.

Table 1 – Protein identification after 2D electrophoresis. Spots are assigned in figure 2

Spot	Identification	Accession code	Protein Score	Protein Score C. I. %	Total Ion Score	Total Ion C. I. %
1	Fibrinogen beta chain	FIBB_HUMAN	619	100	469	100
2	Fibrinogen beta chain	FIBB_HUMAN	628	100	467	100
3	Fibrinogen beta chain	FIBB_HUMAN	899	100	711	100
4	Fibrinogen beta chain	FIBB_HUMAN	892	100	676	100
5	Fibrinogen beta chain	FIBB_HUMAN	642	100	449	100
6	Ig gamma-1 chain C region	IGHG1_HUMAN	595	100	528	100
	Ig gamma-3 chain C region	IGHG3_HUMAN	218	100	189	100
7	Ig gamma-1 chain C region	IGHG1_HUMAN	468	100	380	100

8	Ig gamma-1 chain C region	IGHG1_HUMAN	606	100	539	100
	Ig gamma-1 chain C region	IGHG1_HUMAN	576	100	477	100
9	Ig gamma-1 chain C region	IGHG1_HUMAN	576	100	477	100
	Ig heavy chain V-III region TIL	HV304_HUMAN	109	100	83	100
10	Ig gamma-1 chain C region	IGHG1_HUMAN	612	100	511	100
11	Ig gamma-1 chain C region	IGHG1_HUMAN	610	100	514	100
12	Fibrinogen beta chain	FIBB_HUMAN	790	100	586	100
13	Fibrinogen beta chain	FIBB_HUMAN	644	100	507	100
14	Fibrinogen alpha chain	FIBA_HUMAN	309	100	168	100
15	Ig alpha-1 chain C region	IGHA1_HUMAN	402	100	358	100
16	Ig alpha-2 chain C region	IGHA2_HUMAN	221	100	191	100

Table 2 – Protein identification after TTR co-elution. Protein band are assigned in figure 5

Band	Identification	Accession code	Protein Score	Protein Score C. I. %	Total Ion Score	Total Ion C. I. %
1	Fibrinogen beta chain	FIBB	1250	100	1003	100
2	Fibrinogen beta chain	FIBB	102	100	85	100
3	Fibrinogen gamma chain	FIBG	1050	100	864	100
4	Fibrinogen alpha chain	FIBA	1280	100	1227	100
5	Immunoglobulin mu-chain D-J4-region	IGHM	630	100	542	100
6	Ig heavy chain V region M603	HVM20	157	100	150	100
7	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	436	100	377	100
8	Retinol binding protein	RET4	675	100	595	100
9	Serum albumin	ALB	130	100	39	85

Figure 1

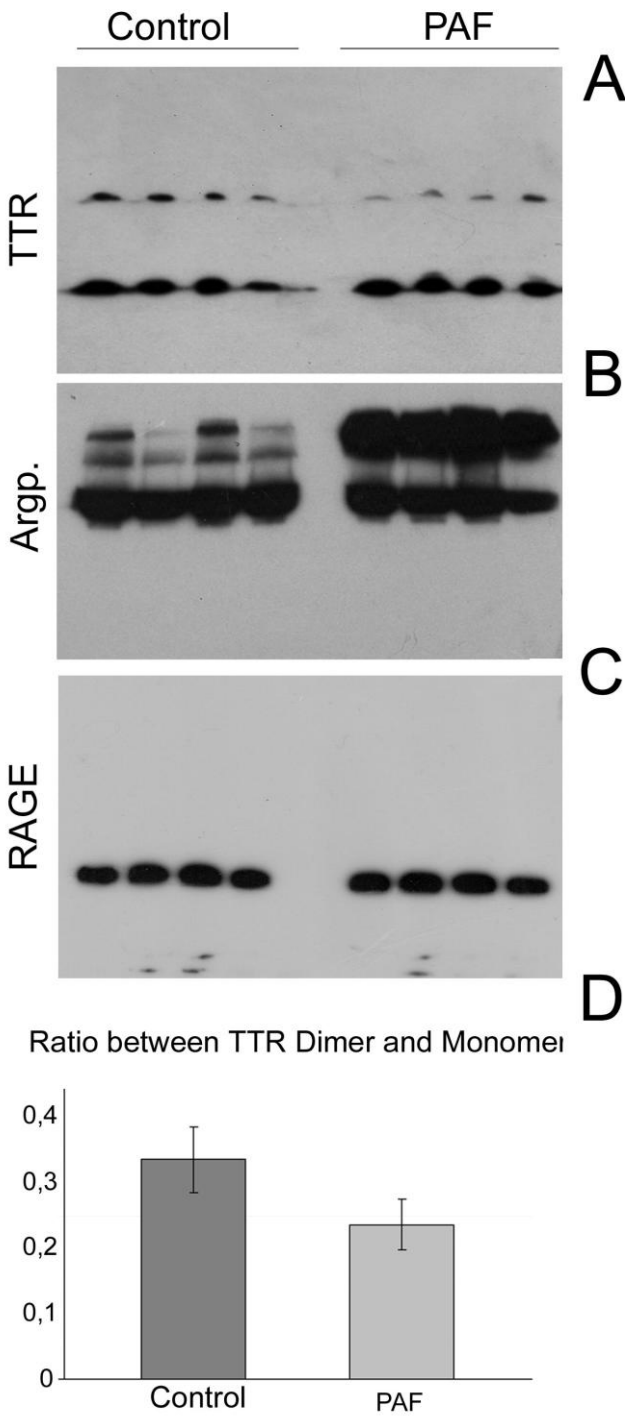


Figure 2

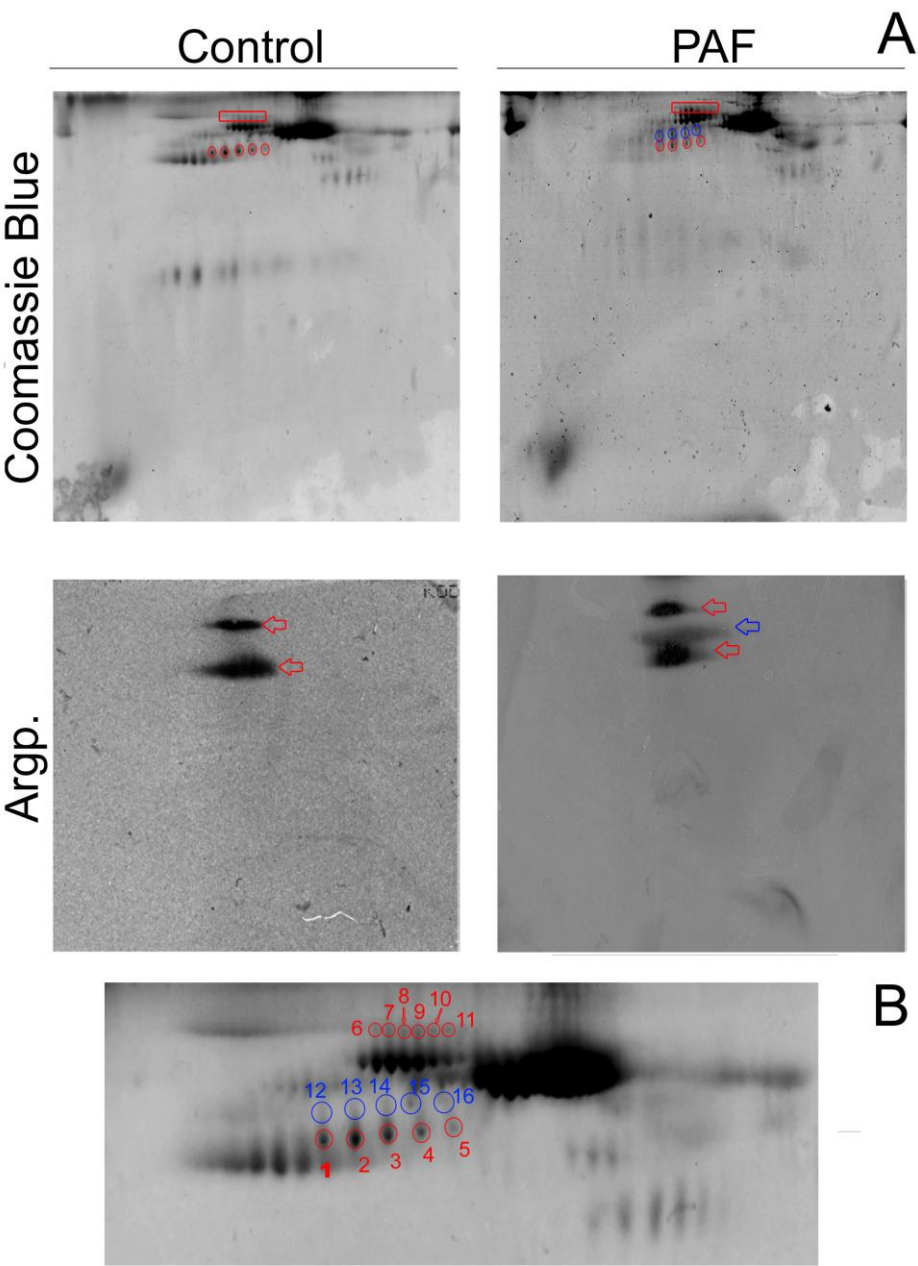


Figure 3

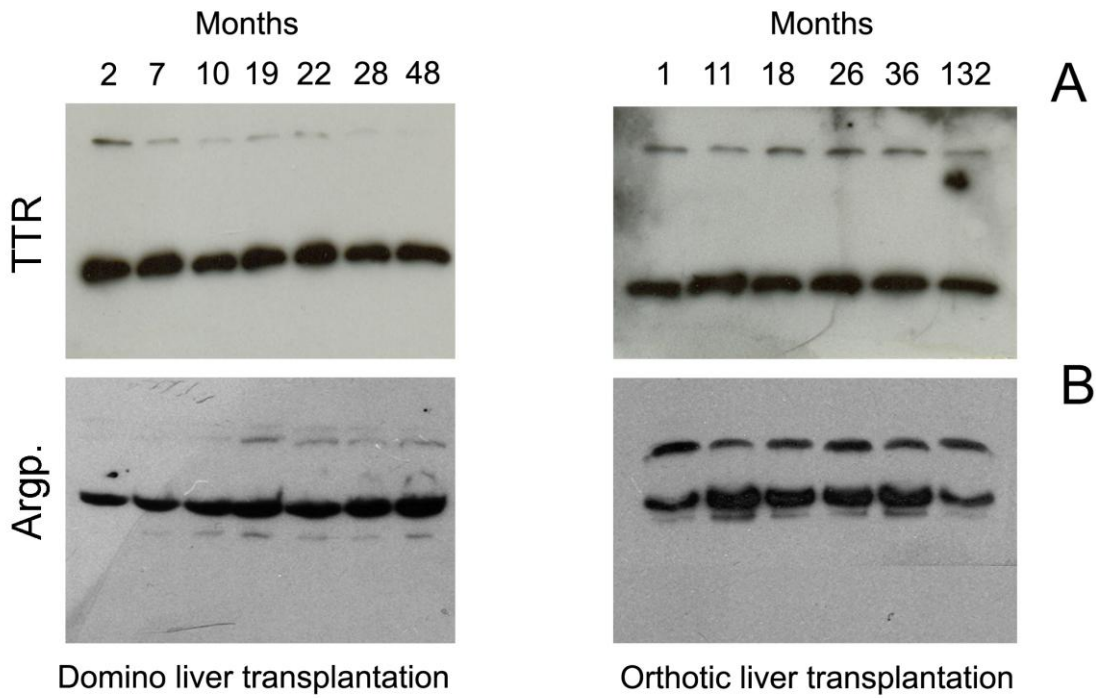


Figure 4

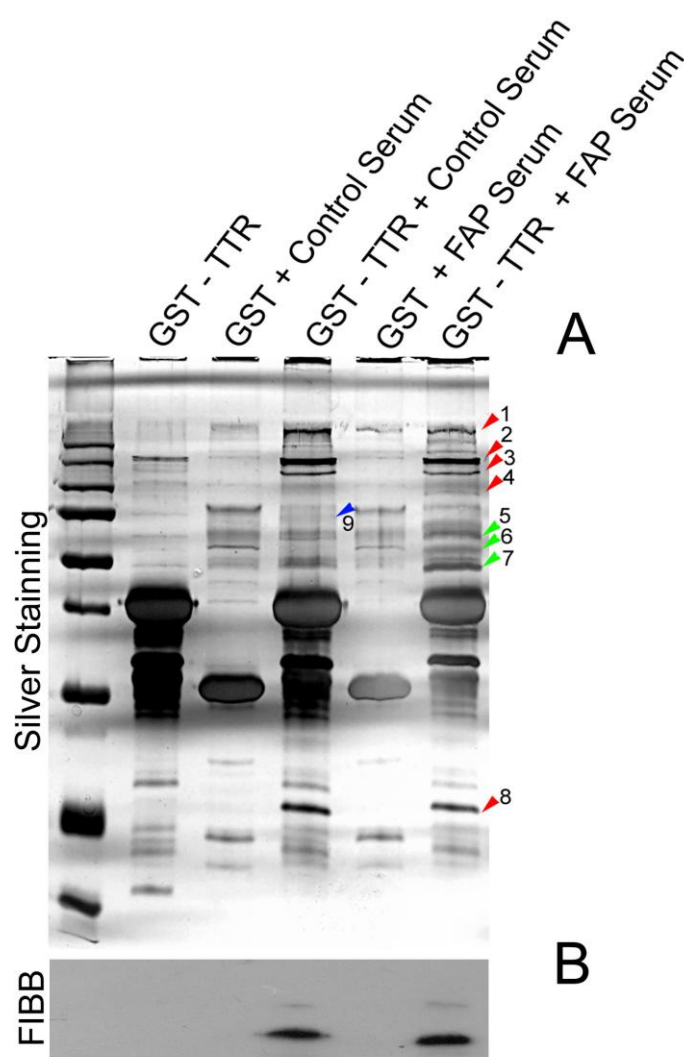


Figure 5

